

# 戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」  
研究課題「多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発」

## 研究終了報告書

研究期間 平成17年10月～平成23年3月

研究代表者：中村 義一  
(東京大学医科学研究所・教授)

## § 1 研究実施の概要

遺伝暗号の発見から 40 年間余り、64 通りの遺伝暗号のうち、終止コドンの解読の仕組みが不明だったが、我々は解離因子がペプチド・アンチコドンにコードし、終止コドンを読み取ることを見出した (Nature 2000)。この発見は遺伝暗号解読の完全解明という基本的な貢献とともに、タンパク質による tRNA 分子の「機能的な擬態」の証明という側面をもつ。これまでに複数の翻訳因子の結晶構造が解かれ、tRNA 分子との「構造的な擬態」が明らかになった。このように、タンパク質と RNA との分子擬態が機能と構造の両面で“make sense”であるならば、RNA を用いて標的分子を擬態あるいは識別する機能性 RNA の創成も夢ではない。

この可能性について、試験管内人工進化 (SELEX) 法とよぶ、ランダムな配列の RNA プールの中から標的分子に結合する特異的な RNA (アプタマー) を釣り上げる技術を利用して試験研究を実施した。この技術は釣り名人がいるごとく、高度な熟練・創意工夫・忍耐を必要とする職人芸に近い。我々は 10 数年、数十種類余の標的タンパク質を「餌」にして「釣り」に励み、人・技・ノウハウを育成し、アプタマー造りを行ってきた。その結果、創出されたアプタマーは標的タンパク質の形状に対して自在な「かたち」を創って標的と結合し、その活性を制御できることを確認した。その他特筆すべき特徴として、①RNA 結合部位を持たない標的や細胞表面受容体に対してアプタマーを創製可能、②塩基修飾により血清中や細胞内で安定化可能、③抗体よりも強い結合力と特異性をもちうる、④細胞内や細胞表面で機能しうる、⑤標的物質の表面構造を広範囲に認識する、といった点が明らかになった。

本研究は標的分子を選び、それらに対する RNA アプタマーを創製し利用するという、目的が明確な「もの作り」プロジェクトであり、以下に示す様々な標的分子に区分して研究項目を定めた。

- (1) 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- (2) 細胞内 RNA 可視化システムの開発
- (3) 抗体 IgG に対する RNA センサーの多目的利用
- (4) RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発
- (5) 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

これまでの研究によって、これら 5 項目を目的とする RNA アプタマーを作出することに成功し、それらの特性に関する生化学的、細胞生物学的、構造生物学的な研究を推進。その結果、本研究領域が目的とする「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」としての RNA アプタマーのポテンシャルと重要性を明確にすることができた。特に、構造生物学的な研究から、RNA のしなやかな造形力を実証することができた。さらに、実用面からは、RNA 医薬としても開発可能なアプタマー分子を複数創出することができ、具体的な医薬開発に踏み出した。今後、それらの実用研究から、難治性の自己免疫疾患に対するアプタマー新薬の開発が期待できる。

## § 2. 研究構想

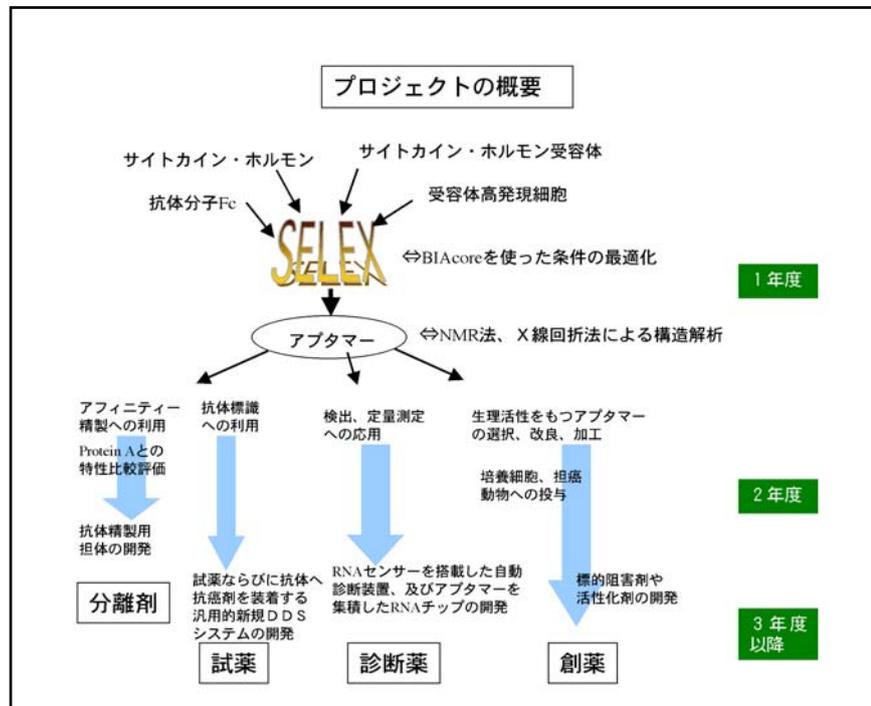
### (1) 当初の研究構想

RNA 研究は近年飛躍的に進展し、RNA の機能や機能性マテリアルとしての学術創成あるいは産業応用に関する豊かな未来が期待される。我々の発見した翻訳因子による tRNA 分子の擬態は、遺伝暗号解読に残された最後の難問であった、終止コドン解読のメカニズム解明という基本問題の解決に貢献したが (Nature 2000)、同時にタンパク質と RNA の分子擬態という生物学の新しい概念を提出した (Cell 2000, TiBS 2003)。この発見は、RNA になるのは 2000, Cell 2000, TiBS 20033

が単に一次配列や配列相補性に依存して働くだけでなく、タンパク質と同レベルの個性ある立体構造を形成して機能する高分子マテリアルとしてのポテンシャルを強く示唆するものである。本研究では、RNA の試験管内人工進化 (SELEX) 技術を利用して、各種の標的分子に対する特異的な高親和性 RNA 分子を創成し、それらを用いた新しい計測技術 (RNA センサー) の開発、細胞内外の生理活性因子の調節デバイス (RNA モジュレーター) の開発、それら新機能性 RNA 創成のための新技術の開発を行う。そして、これらの研究を統合して、タンパク質と RNA の分子擬態に関する学理解明とともに、RNA を計測・医用マテリアルに利用する次世代の計測・分析基盤技術の確立を目指した。

SELEX 法は様々なバリエーションの RNA 分子を標的のタンパク質と何度も結合→解離→増幅→再結合を繰り返すことで、より強く結合する RNA 分子のみを“進化”させる技術である。この方法は魚釣りに似ており、4 種類の塩基 (AUGC) がランダムに並んだ RNA プール (「釣り堀」) に標的となるタンパク質を「餌」にして、結合する RNA を釣り上げ、これを増幅して 2 回目のプールを作製、釣りを繰り返す。このサイクルを 10 数回行うこと

によって、最終的に標的タンパク質に強く特異的に結合するアプタマーを選択できる。この方法を利用し申請したプロジェクト (当初計画) の概要を右図に示す。これまでにその目標はほぼ達成できたと評価する。



### (2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

本研究の中で、予想以上に進展した研究項目がアプタマー創薬である。特に、炎症系サイトカインであるインターロイキン 17 (IL-17) に対して作出したアプタマーは、in vitro

の細胞試験と in vivo の動物試験で優れた薬効を示したため、具体的な医薬開発品として研究を強化した。

### §3 研究実施体制

#### (1)「東大医科研」グループ

##### ①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
中村 義一	東京大学	教授	H17.10～H23.3
山村 康子	東京大学	特任准教授	H18.4～H22.4
大内 将司	東京大学	助教	H17.10～H23.3
石黒 亮	東京大学	特任助教	H20.4～H23.3
大出 暁子	東京大学	派遣技術員	H18.6～H21.6
小林 佳代	東京大学	派遣技術員	H20.4～H21.3
笠貫 しづ江	東京大学	派遣技術員	H18.6～H20.3
李玉順	東京大学	派遣技術員	H20.5～H20.7
高野 雅代	東京大学	派遣技術員	H19.4～H19.6
石田 順子	東京大学	教務補佐員	H19.9～H19.11
藤田 りつ子	東京大学	博士研究員	H17.10～H18.6
河合 利枝	東京大学	技術員	H17.10～H18.6

##### ② 研究項目

- 1)細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- 2)RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発
- 3)細胞内 RNA 可視化システムの開発

#### (2)「リボミック」グループ

##### ① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
藤原 将寿	(株)リボミック	開発研究部長	H17.10～H23.3
宮川 伸	(株)リボミック	探索研究部長	H17.10～H23.3
金 玲	(株)リボミック	主任研究員	H18.4～H21.3
山崎 聡子	(株)リボミック	主任研究員	H18.4～H23.3
阿部 智行	(株)リボミック	主任研究員	H18.6～H21.3
出射 真奈	(株)リボミック	研究員	H18.4～H18.5
岩田 由紀子	(株)リボミック	研究員	H17.10～H19.7
千葉 美佳	(株)リボミック	研究員	H17.10～H20.4
猪股 恵美礼	(株)リボミック	研究員	H18.6～H23.3

##### ② 研究項目

- 1)細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- 2)RNA アプタマーの免疫毒性に関する研究
- 3)抗体 IgG に対する RNA センサーの多目的利用

#### (3)「埼玉がんセンター」グループ

##### ①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
神津 知子	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	主席主幹	H18.4～H23.3

田中 陽一郎	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	研究員	H18.4～22.3
福永 淳一	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	研究員	H18.4～H23.3
迫田 絵理	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	技術員	H18.4～H19.4
松田 美保	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	技術員	H18.4～H20.3
柴 康弘	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	技術員	H19.6～H20.3
戸井田 勝	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	技術員	H20.4～22.3
泊 亜希	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	技術員	H20.4～21.3
福井 布美代	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	技術員	H21.5～23.3
遠藤 絵美	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所	技術員	H22.5～23.3

## ②研究項目

- 1) 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- 2) 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

## (4)「千葉工大」グループ

### ①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
坂本 泰一	千葉工業大学工学部	准教授	H17.10～
田中 卓	千葉工業大学	専門研究員	H18.1～H18.3
野村 祐介	千葉工業大学工学部	特別研究員	H18.10～
富士原 和也	千葉工業大学工学部	研究補助員	H19.4～H20.1

## ②研究項目

- 1) NMR 法を用いた RNA アプタマーの立体構造解析
- 2) RNA アプタマーとターゲットとの相互作用解析
- 3) X 線結晶構造解析法を用いた RNA アプタマーとターゲットの複合体の立体構造解析

## § 4 研究実施内容及び成果

### 4.1「東大医科研」グループ

#### (1)研究のねらい

##### 1. 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発

細胞膜表面に発現している受容体に対するモノクローナル抗体の取得が困難なことは、基礎研究並びに応用研究の発展にブレーキをかけている。そこで、細胞膜表面に発現している受容体やリガンドをターゲットに SELEX 法により RNA アプタマーを作製し、特性解析、センサーとする疾患

の診断システムを開発する。また、得られた RNA アプタマーの薬理効果を確認することで、RNA 治療薬の開発を検討する。

## 2. RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発

一般的に RNA に対する特異的な抗体の作製は困難である。また、現在までに報告されている核酸に対する核酸プローブは、塩基対形成に依存したものであり、RNA の高次構造を識別することはできない。そこで、標的 RNA を、塩基配列ではなく高次構造によって認識する RNA アプタマーを作製し、非翻訳 RNA (non-protein-coding RNA、ncRNA) を構成する天然アプタマーの高次構造を識別できる世界初のツールの開発を実現する。

## 3. 細胞内 RNA 可視化システムの開発

既存の RNA 標識法は、細胞外の RNA の分析法であり、細胞内 RNA の標識には使えない。本研究では、in vivo RNA 標識を可能にするために、蛍光化合物に対して高結合性の RNA アプタマーを創成し、その配列をタグとして任意の RNA 末端に付加する in vivo 発現系を構築する。

### (2) 実施方法・実施内容・成果

#### 1. 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発

##### ① 抗 IL-17 アプタマー

自己免疫疾患は、自己がもつ生体成分を異物として認識し、自己の生体成分に反応するリンパ球や抗体が自己の身体を攻撃する病気で、慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの膠原病や、多発性硬化症等が知られている。しかし、発症メカニズムや病態悪化要因については未だ不明な部分が多い。近年炎症系サ

イトカイン IL-17 の重要性 (慢性関節リウマチ、気管支喘息、炎症性腸疾患、多発性硬化症等の発症への中心的な関与) が俄にクローズアップされるようになった。そのため、追加プロジェクトとして、IL-17 を標的とする新規な自己免疫疾患治療薬の開発を昨年度から実施した。これまでに、1) SELEX による抗 IL-17 アプタマーの作出、2) BIAcore

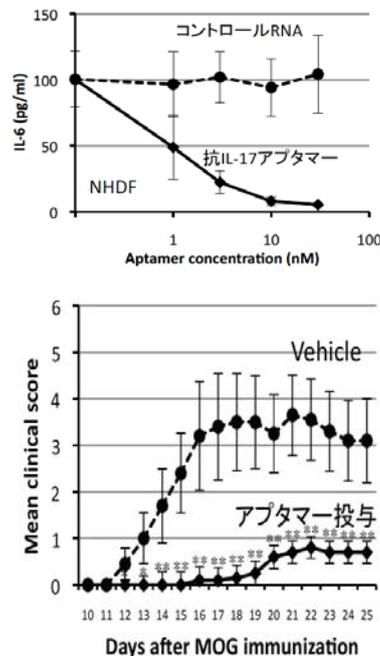


図1 IL-17アプタマーによるIL-6産生阻害  
IL-6産生で見た抗IL-17アプタマーの阻害活性(ELISA法により検出)  
NHDF (normal human dermal fibroblast) 細胞をIL-17Aで刺激24時間後のIL-6産生を確認。同じ濃度の特異的中抗体に比べ、高い阻害活性を持っている。10nM以上の濃度で培地に加えた場合、IL-6の産生はほとんど検出されない。

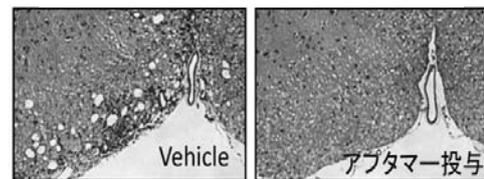


図2 IL-17アプタマーは自己免疫性脊髄炎の発症を抑制する  
グラフはアプタマー投与試験結果(n=10)。写真は脊髄組織。アプタマーの投与で、炎症細胞の浸潤や脱髄が観られなくなる。

による IL-17 との特異的結合と受容体との結合阻害の確認、3)アプタマー分子の最適化(短鎖化と修飾)を完了し、4)培養細胞を用いた IL-17 に対する強い阻害効果を確認した(図1)。次に、4)自己免疫疾患のモデルマウスを用いた in vivo 薬理試験を行ない、詳細な解析を行った。(図2) (2009年 PCT 出願)。ヒト多発性硬化症のモデルマウスである、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルマウスでは極めて高い発症抑制効果、リウマチ関節炎モデルマウスでは、発症抑制効果及び治癒効果を確認した。

## ②抗 TGF-βRII アプタマー

His 標識可溶化型ヒト TGF-β II 型受容体(TGF-βRII)を標的として SELEX により、抗 TGF β RII アプタマーの単離に成功した。作出アプタマーについて、1)TGF β RII への特異的な結合 (BIAcore による生体分子相互作用測定)、2)細胞レベルでの活性(TGF β 依存的細胞増殖抑制細胞株を用いた増殖回復試験と Smad3 の核内移行の阻止)を確認し、3)動物での薬効試験を実施するとともに、4)蛍光色素 FITC、Alexa Fluor 標識による RNA センサーの開発(フローサイトメトリーを用いた II 型、III 型受容体の細胞表面発現パターン解析プローブ)を推進している。

### 2. RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発

- 1) HIV-1 ウイルスの制御 RNA、TAR-RNA に対する RNA アプタマーの取得に成功し、またこのアプタマーが、金属依存性において物理化学的に興味深い特性を示したため、その解析を行った。一方、構造については、フランスのグループより類似のアプタマーの詳細な複合体構造が報告されたため、本プロジェクトでは行わない事とした。
- 2) 当初の計画には含まれていなかったが、塩基対形成に依存せずに RNA 構造を認識する RNA アプタマーを取得するための普遍的な実験系として、人工のリボザイム(RNA 酵素)の触媒反応を指標とした選別系の確立に着手し、その確立に成功した。また、この選別系によって、天然の RNA 構造体において RNA-RNA 相互作用には関与しない C ループに対するセレクションを行い、C ループに対する全く新規な受容体モチーフ(アプタマー)の取得に成功した(NAR 2008)。この系は様々な RNA 構造体に対して特異的な認識能をもつ RNA センサーの開発に汎用的に利用することが期待できる。今後、作出アプタマーの構造解析、及び抗 rRNA アプタマー等の作製を行い、一次配列の相補性に依存しない RNA-RNA 相互認識の基本原理の理解を目指す。

### 3. 細胞内 RNA 可視化システムの開発

RNA の細胞内蛍光標識法の開発を目的として、細胞膜透過性の Cy3 に対するアプタマーの作製に成功した。アプタマー結合により Cy3 の蛍光が増強し(図 3)、また、Cy5 に対しても交差性を有することを見出した。また、Cy3 アプタマーを固相化したチップが特異的な Cy3(蛍光)センサーとして働くことも確認した。この RNA アプタマーの構造特性を利用して、新規な Binary プローブを開発し、DNA 配列や RNA-RNA 相互作用の検出に利用できることを証明した。

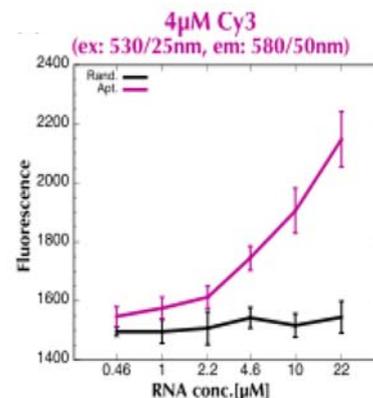


図3 アプタマー結合による Cy3 蛍光増感

#### (3) 当初の研究計画に対する現在の研究進捗状況

当初の研究計画はおおむね順調に進捗した。抗 TSHR アプタマーについては、共同研究先の方針変更によって TSHR 発現細胞の供給がストップしたため、やむを得ず抗 TSHR アプタマーの作製を断念したものの、抗 IL-17 アプタマーの研究開発は予想以上に進展した。

#### (4) 新たな研究の展開

- 1) 自己免疫疾患の治療薬の開発を目的としてミッドカイン(MK)アプタマーの医薬開発を進めてきたが(後述)、同様にあるいはそれ以上に、IL-17 の重要性が最近明らかになってきた。そ

のため、急遽、抗 IL-17 アプタマーの開発を開始。細胞レベルでほぼ完全に IL-17 活性を阻害できる分子を特定し、最適化も完了。自己免疫疾患モデルマウスでその薬効を確認している。今後、医薬開発への本格的な推進が必要となる。

- 2) 予想に反した、aFGF アプタマーによるヘパリン活性の代替は、RNA によるヘパリンの機能的擬態を示唆するもので、世界初の RNA agonist 候補分子となる。今後、構造レベルでもヘパリンとの類似が確認できれば、本プロジェクト起案の原点ともいえる(研究代表者にとってですが)「分子擬態」を RNA から機能・構造の両面で実証できることになり、学術的な意義は大きい(かつ、研究代表者のライフワークの達成に一歩近づける)。

## 4.2 「リボミック」グループ

### (1) 研究のねらい

#### 1. 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発

我々はサイトカインの一種であるミッドカイン (MK) に着目した。MK は細胞の生存や移動を促進し、癌の進行、炎症性疾患の発症、そして傷害を受けた組織の保存、修復に深く関与していると考えられている。MK が関与する疾患として癌やリウマチ、多発性硬化症を含む自己免疫疾患が挙げられるが、効果的な治療薬がなく世界で約 250 万人の患者がいるとされる多発性硬化症を対象疾患とした。多発性硬化症は脳、脊髄、視神経などに脱髄病変が認められ、多彩な神経症状の再発と寛解を繰り返す疾患である。上記理由から、標的分子に MK を選定し、種々の自己免疫疾患に対する治療薬開発を目的とした。

#### 2. RNA アプタマーの免疫毒性に関する研究

核酸医薬品は、マテリアルが核酸故に、生体内の免疫防御システムに反応する可能性がある。例えば、生体内には病原微生物が生体内に侵入した場合、それに対応する防御システム作動機序の一つに、Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) の存在が知られている。ヒトでは 10 種類明らかになっており、特に核酸を認識するものとして、二本鎖 RNA を認識する TLR3、一本鎖 RNA を認識する TLR7 と 8、CpG DNA を認識する TLR9 が知られている。TLR3, 7, 8, 9 は主にエンドソームに発現しており、細胞内にデリバリーする必要があるアンチセンス医薬や siRNA 医薬にとっては無視できない存在である。更には、TLR3 は、細胞内のみならず、細胞表面にも発現しているという報告がなされ、細胞外因子をターゲットとするアプタマーにも免疫反応を誘導する可能性が示唆された。

#### 3. 抗体 IgG に対する RNA センサーの多目的利用

医療用抗体は、レミケードやハーセプチンをはじめ 20 種類以上が承認・販売されており、世界中で活発に開発競争が繰り広げられている。これらは培養細胞を用いて製造され、精製過程で抗体に親和性のある Protein A 樹脂が用いられている。しかし、Protein A 樹脂を用いた精製では抗体を酸性条件下で溶出する必要があり、その過程で抗体が変性もしくは凝集する可能性が指摘されている。我々はヒト IgG に特異的に結合する RNA アプタマーの作製に成功し、これを用いた新規抗体精製用分離剤の実用化を目指して研究開発を実施。このアプタマー樹脂は抗体を中性で溶出することができることが大きな特徴であり、酸性条件下で失活し製品化するのに困難を極めた新規抗体医薬品の実用化に大きく寄与できるものと期待される。今後、本アプタマー樹脂を工業生産レベルに応用可能な動的クロマトグラフィーでの精製効率、収率を向上させるための改良を行う。

## (2) 実施方法・実施内容・成果

### 1. 抗 Midkine RNA アプタマーを用いた創薬への展開

自己免疫疾患罹患者数は、世界では約 3 億人とも言われており、疾患名は、関節リウマチ、乾癬、I 型糖尿病、多発性硬化症等数多く知られている。自己免疫疾患は、自己を非自己と認識して、自己を攻撃する免疫系の異常によりおこる疾患である。我々は、自己免疫疾患の創薬標的の候補分子として名古屋大学の村松教授らが発見した炎症性サイトカイン・成長因子の Midkine に着目した。これまでの研究から、Midkine が自己免疫疾患の原因分子の一つとして考えられている。特に、難治性疾患である多発性硬化症に焦点を絞って探索研究を開始した。その背景とし、Midkine 遺伝子が多発性硬化症の病態動物モデルである EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: 実験的自己免疫性脳脊髄炎) ラットの脊髄で高発現していることが上げられる。また、名古屋大学 錫村教授らのグループにより、Midkine ノックアウトマウスを用いて、Midkine と多発性硬化症との関連性について詳細な検討がなされた。その結果、Midkine ノックアウト EAE マウスは、野生型 EAE マウスに比較しその病態が抑制されること、そのノックアウトマウスに Midkine を持続注入することで野生型と同様の病態スコアを示すことが明らかになり、Midkine が EAE の発症に関与することが示唆された。さらに、Midkine ノックアウト EAE マウスの脾臓における調節性 T 細胞 (Treg 細胞: CD4 陽性/CD25 陽性/Foxp3 陽性細胞) のポピュレーションが亢進し、それが Midkine の持続注入によって反転することも明らかとなった。この結果から、Midkine が Treg 細胞を (直接あるいは間接的に) 抑制することにより、病態発症・悪化が生じたと錫村らは考察している。

また、最近の多発性硬化症の病態生理学的研究から、免疫寛容に関与している Treg 細胞が重要な役割を演じているとの知見が蓄積されつつある。例えば、多発性硬化症患者では、Treg 細胞数の減少や機能の低下が認められる。更には、Th17 細胞と病態が関係しているとの報告がなされ、その細胞の制御を Treg 細胞が行っていることが明らかになってきた。

そこで我々は、抗 MK アプタマーを作製し、医薬品への応用を考え研究に着手した。

#### ① Midkine アプタマーの取得

SELEX 法により、Midkine に対するアプタマーの取得を試みた。その結果、数十種類の Midkine に対し結合能を有するシードアプタマーを見出した。次に、細胞を用いた *in vitro* 試験を実施、Midkine の生理作用を抑制するアプタマーの評価を行った結果、数種のアプタマーを特定した。その後、医薬品に耐えうるアプタマー、つまり生体内に投与しても、容易に分解されなく且つ、医薬品製造可能な鎖長まで短くしたアプタマーの作製を試み、候補アプタマーを見出すに至った。その候補アプタマーの *in vitro* での評価結果を図 4 に示した。濃度依存性が認められ、その IC<sub>50</sub> 値は、10<sup>-8</sup>M オーダーの値を示した。

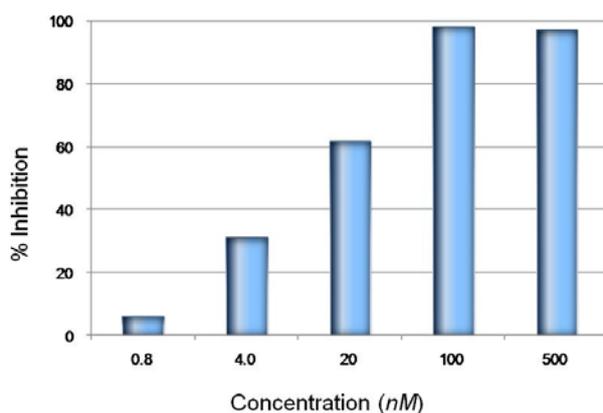


図 4 候補アプタマーの Midkine に対する生理阻害活性  
0.8 nM~500 nM の間で 5 段階希釈した候補アプタマーを、Midkine により誘導される細胞遊走活性を指標にその阻害活性を測定した。

#### ② Midkine アプタマーの EAE マウスモデ

## ルに対する病態抑制効果

次に、得られた候補アプタマーの EAE マウスモデルを用いた薬効薬理試験を実施した。MOG で感作した後、候補アプタマーを、1 mg/kg の用量で、2 日に一回腹腔内投与した。その結果を図 5 に示した。候補アプタマー投与群は、溶媒投与群に比較し、有意に病態抑制効果を示した。これらの結果は、候補アプタマーは、Midkine を抑制することにより、EAE の病態悪化抑制に働いた可能性を示唆している。

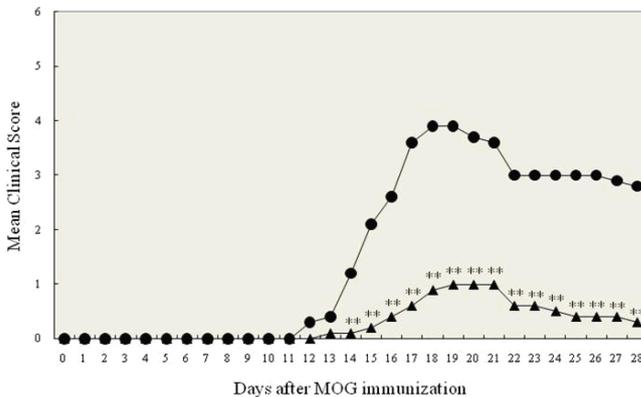


図 5 候補 Midkine アプタマーを投与した EAE モデルマウスの臨床スコア  
野生型 EAE モデルマウス (C57BL/6、♀、8 週令) に対して候補 Midkine アプタマー 1 mg/kg (▲) および、溶媒のみ (●) を 2 日に一回、腹腔内投与した。Y 軸は臨床スコア (0: 症状なし、1: 尾が垂れる、2: 仰向けにして起き上がれない、3: 不安定歩行、4: 軽度の後肢麻痺、5: 重度の後肢麻痺、6: 死亡) の平均値を表す。\*\*:  $p < 0.01$  Dunnett's test

## ③Midkine アプタマーの血中薬物濃度測定法の確立

医薬品開発において血中薬物動態の知見を得ることは、必要不可欠である。その評価には、アプタマーの血中薬物濃度測定法を確立する必要がある。アプタマーについては、アプタマーの塩基配列を利用した hybridization を原理とした ELISA 変法が報告されている (図 6)。まず、標的アプタマーに対して相補的な配列を持つ、標的アプタマーの半分程度の鎖長の相補配列を持つ固相化プローブと、末端に FAM (carboxyfluorescein) を結合させた、残りの相補的配列を持つ検出用プローブを各々用意する。固相化プローブをマイクロプレートに固相化し、標的アプタマーと検出用プローブを hybridize させた溶液をプレートに入れ固相化プローブと反応させる。その後、HRP (horseradish peroxidase) を付加した抗 FAM 抗体、次に HRP の酵素作用で発色分子に変換する基質を入れ、その吸光度を測定することで、標的アプタマーを定量する。その結果、3 ng/mL ~ 300 ng/mL の濃度範囲で定量可能との結果を得た (図 7)。本法は、核酸の特徴を利用していることから、その特異性は高く、また、薬物投与動物の血液サンプルに含まれる夾雑物を前処理で除く操作が不要という大きな特徴を有している。

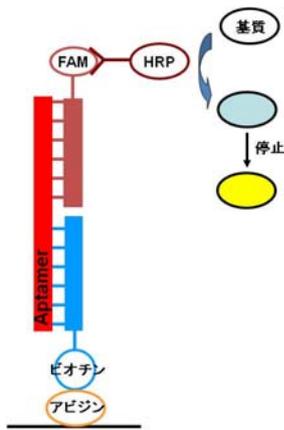


図6 アプタマーの定量法の原理

アプタマーの半分の鎖長の配列相補鎖のプロープを固相化し、残り半分の鎖長のFAM付加相補鎖プロープを反応させ、その後HRP付加FAM抗体を添加し、HRPの基質分子を入れ、発色分子の吸光度を測定することで、定量を行う。

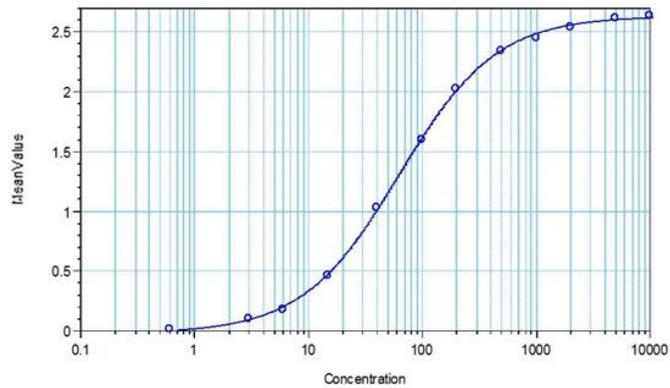


図7 候補Midkineアプタマーの検量線

横軸は濃度 (ng/mL)。縦軸は、OD<sub>450</sub> 値。検出限界は、3 ng/mL。

## 2. RNAアプタマーの免疫毒性に関する研究

### ①アプタマーによる過剰免疫反応誘導の有無の検討

本研究では、細胞外因子であるサイトカインや細胞外受容体を標的にしたRNAアプタマーが免疫系を活性化するか否かについて検討を行った。ヒト末梢血単核球 (PBMC) を用いた *in vitro* 実験でサイトカイン5種 (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ) の産生量をELISAにて測定した。表1には、実験に供した核酸を示した。実験には、核酸10  $\mu$ Mになる様に、 $3 \times 10^5$  個のPBMCに処理をする。処理後24時間目に細胞培養上清を回収し、培養上清中のサイトカインを定量した。核酸の処理には、核酸のみ、及び、細胞内へ核酸を導入して反応をみる目的で、遺伝子導入試薬であるカチオンリポソームのDOTAPに包埋した核酸をPBMCに処理をした場合についても検討を行った。その結果、TLR7/8を刺激することが明らかとされているR0006-3は、DOTAPの有無に関係なくサイトカインの産生を誘導したが、現在、第II相臨床試験中のヌクレオリンをターゲット分子とするアプタマーAS1411及び、修飾、鎖長の異なるアプタマーにその作用を見出すことが出来なかった(図8)。また、PBMCドナーを変えて同様の実験を実施したが、傾向は変わらなかったことより、アプタマーには、免疫反応を惹起する活性は有していないと考えられた。

表1 実験に供した核酸

核酸	修飾	鎖長(nt)	受容体
poly(I:C)	RNA	mixture	TLR3
R0006-3	PS-RNA	42	TLR7/8
CpG-A3	DNA	66	TLR9
AS1411	DNA	26	
Apt-1	2' OMe-RNA	35	
Apt-2	2' F, OMe-RNA	26	
Apt-3	2' F, OMe-RNA	27	

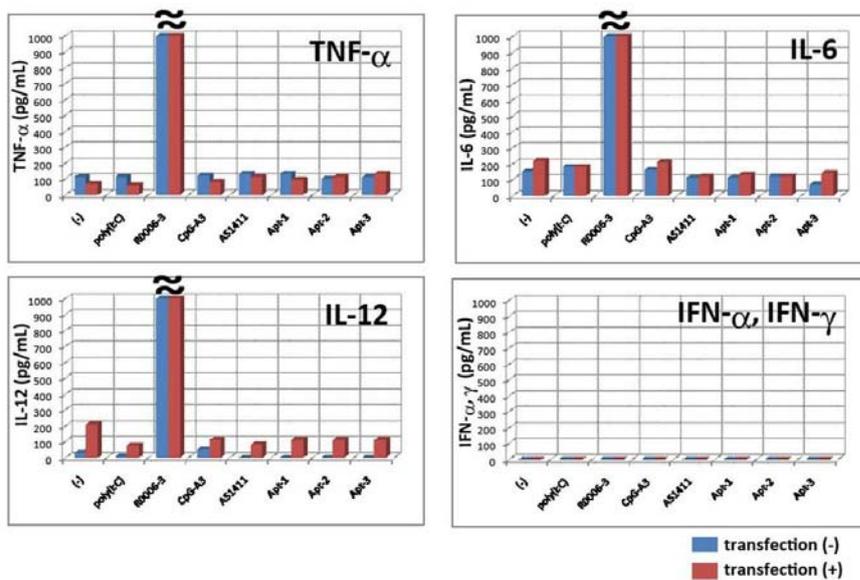


図8 PBMCに処理をした各種核酸におけるサイトカイン産生

### 3. IgG に対する RNA センサーの多目的利用

ヒト IgG アプタマーをリガンドとした、抗体医薬品およびFc 融合タンパク質の精製用分離剤の研究開発を行った。現在使用されている分離剤のほとんどは Protein A 樹脂であるが、樹脂から脱落した Protein A の毒性の問題や価格の問題などから新規リガンドが求められている。特に Protein A 樹脂は、結合した抗体を溶出するときに酸性にする必要があり、その際にタンパク質が変性または凝集することが問題となっている。よって、中性で精製できる樹脂を作製することで、今まで手に入れることができなかった抗体やFc 融合タンパク質が簡便に得られるようになることが期待される。

本プロジェクト開始前に、ヒト IgG の Fc 部分に特異的に結合するアプタマーを SELEX 法を用いて取得した。また、このアプタマー樹脂を用いることでヒト抗体が中性で精製できることを示した。本プロジェクトではこのリードアプタマーの改変を行い、精製容量、ヌクレアーゼ耐性、アルカリ耐性の向上を目指した。また、実際の抗体医薬品精製を模擬し、CHO 細胞培養上清から抗体医薬品が高純度で精製できることを示した。更に、NMR 構造解析、X 線構造解析、生化学的実験を行うことで IgG アプタマーと抗体の結合様式および溶出メカニズムを解明した。以下にその詳細を記す。

#### ① 精製容量の向上

23mer のリードアプタマーに DNA、2' -O-メチル、2' -F、ホスホロチオエートなどの修飾を加えた。IgG に対する結合活性を表面プラズモン共鳴法 (BIAcore) で確認した。アプタマーをセファロースやトヨパールなど各種担体に結合した。また、アプタマーと担体をつなぐリンカーを設計した。数十種類の異なるアプタマー樹脂を作製し、最終的に 30mg/mL-resin の精製容量を有する樹脂の作製に成功した。これは市販の Protein A 樹脂の容量に匹敵する値である。

#### ② ヌクレアーゼ耐性の向上

23mer のリードアプタマーに DNA、2' -O-メチル、2' -F、ホスホロチオエートなどの修飾を加えることで、結合活性を維持したままヌクレアーゼ耐性を向上させることを試みた。血清分解実験を行い、ヌクレアーゼ耐性の低い部分を特定し、その部分にピンポイントで

修飾を加えることで安定性を飛躍的に向上させることに成功した。CHO 細胞培養上清中で 37°C に保持したところ 10 時間後にも全く分解が起らなかった。

### ③ アルカリ耐性の向上

23mer のリードアプタマーに DNA、2' -O-メチル、2' -F、ホスホロチオエートなどの修飾を加えることで、結合活性を維持したままアルカリ耐性を向上させることを試みた。結果として 0.1N NaOH 中で 6 日間保持しても全く分解しないアプタマーの作製に成功した。

### ④ ヒト化抗体 CamPath の精製

既に医薬品として使用されているヒト化抗体 CamPath (anti-CD52 mAb) を CHO 細胞培養上清から精製した。その結果、高純度の CamPath を得ることに成功した。また同様に、CHO 細胞で産生した Fc 融合タンパク質の精製を行ったところ、高い活性を維持したタンパク質を精製することができた。

### ⑤ 動的精製法の検討

動的精製法における IgG アプタマー樹脂の性能を評価した。アプタマー樹脂を作製し、カラムに充填して精製用カラムを作製した。クロマトグラフィーを用いて血清抗体の精製を行ったところ、流速 0.2 および 1.0 mL/min で高純度の IgG を得ることができた。

### ⑥ IgG アプタマーの分析法の確立

IgG アプタマーの品質管理のために HPLC と LC/MS を用いた分析法を確立した。HPLC はイオンペアー試薬として TEAA と HFIP を用いた高分解能測定法を確立した。また、LC/MS は高分解能質量分析計を用いることでフルオロ基の欠落体が分析できるようになった。

### ⑦ 構造解析

NMR と X 線回折を用いてアプタマーと IgG の複合体の構造解析を行った。本研究は大阪大学と千葉工大との共同研究として実施された。その結果、アプタマーのグアニンとシトシンが IgG のチロシンとプロリンとスタッキング結合していることがわかった。多くの場合アプタマーはリン酸基の負イオンを利用してイオン結合でタンパク質と結合するが、本研究結果よりアプタマーが他のメカニズムによってタンパク質と強く結合できることが示された。

### ⑧ 中性溶出のメカニズムの解明

アプタマーに結合した IgG は EDTA などのキレート剤を添加することで中性溶出することができる。結晶構造解析の結果、本アプタマーは 2 価イオンを内部に含んでいることがわかった。EDTA がこの 2 価イオンを取り除くことで、アプタマーの構造が崩れて IgG と結合できなくなることが予想された。実際、2 価イオンが存在しない生理食塩水や PBS 中ではアプタマーが IgG に結合しないことが BIAcore の実験より示された。また、CD と Tm 測定を行ったところ、2 価イオン存在の有無でアプタマーの構造が変化していることが示唆される結果を得た。

### ⑨ アプタマーのリフォールディング

IgG アプタマーは 2 価イオンの有無によって活性型になったり不活性型になったりすることがわかった。そこで、本アプタマーがどのくらいリフォールディングを繰り返すことができるか調べた。実験には BIAcore を使い、ランニングバッファーに MgCl<sub>2</sub> を含む緩衝液を使用し、IgG と EDTA 溶液を交互にインジェクションした。その結果、アプタマーは 100 回以上再生可能であることがわかった。

## (3) 当初の研究計画に対する現在の研究進捗状況及び新たな研究の展開

- 1) 本研究において MK アプタマーの医薬品開発に必要な準備研究はほぼ終了し、今後、臨床試験において、ヒトへの安全性・効果を確認する段階へ進める予定である。

- 2) 本研究成果より、アプタマーには、siRNA で懸念されている免疫活性化に伴う毒性が低いことが示された。本方法を確立したことより、アプタマーの免疫毒性をハイスクリーンで確認できるようになった。
- 3) 抗 IgG アプタマーは抗体精製用の affinity 樹脂として完成した。今後、市場に提供しその用途や販路を拡大するために、基礎研究部門を中心に試供品を提供し、本アプタマー樹脂の実用性を評価してもらおう。特に中性溶出の利点を評価してもらい、今まで得ることのできなかつた抗体や Fc 融合タンパク質がどのくらい存在するのか調査する。もし本アプタマー樹脂の実用性が証明された場合は、今まで研究者が手にすることのできなかつたタンパク質を容易に得ることができるようになり、その科学技術に与える影響は大きい。

#### 4. 3 埼玉がんセンターグループ

##### (1) 研究のねらい

さまざまな疾患の中でも、癌は原因が多様であり、わずかな癌細胞の残存からも再発が起こることなどから、超高感度な癌細胞を発見する診断法が必要とされている。アプタマーは、現在広く応用されている抗体よりも結合の強さ、特異性の面で優れていることがこれまでの研究でわかってきた。このため、アプタマーを利用し、癌細胞に特異的なタンパク質の検出系を作製することによって、従来法よりも高感度な癌の診断法を開発することが可能となる。さらに、癌細胞特異的な細胞表面タンパク質の中には、それに結合し、リガンドとの相互作用を阻害することで癌細胞の増殖阻害などの抗癌効果が得られるものがある。これらのタンパク質を標的としてアプタマーを作製すれば、高感度診断法と同時に、抗癌剤として働くアプタマーを作成することが可能である。そこで、本研究では、次の二点についてねらいを定め、研究を進めている。

##### 1. 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発

癌の検出だけでなく治療にも応用可能な細胞外受容体、リガンドに対する RNA センサーおよび治療薬を開発する。

##### 2. 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

白血病由来融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

##### (2) 実施方法・実施内容・成果

##### 1. 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発

アプタマーを取得する標的タンパク質は、癌と炎症に関与する受容体およびリガンドを中心に選択した。最近、慢性肝炎から肝癌への進行、ピロリ菌と胃癌の関係など、炎症応答と癌化の研究の進展から、炎症性サイトカインとその受容体による細胞へのシグナルが癌細胞の生存や増殖に重要な役割を示すことがわかってきた。

## 2. 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

白血病では、*AML1-MTG8* を代表とする融合遺伝子が形成され、そこから融合タンパク質が発現することで癌化の大きな要因となっている。白血病では、治療後の残存白血病細胞の量はその後の再発に大きなファクターとなる。また、癌の早期発見のためにも高感度な検出法の開発が必要とされる。我々は、すでに *AML1* および *MTG8* に結合するアプタマーを作製した。また、それぞれのアプタマーの改良により、*AML1-MTG8* の *AML1* 部分と *MTG8* 部分のそれぞれに同時にアプタマーを結合させることに成功した。本研究では、これらのアプタマーを使用した白血病融合タンパク質の超高感度測定法の開発を行っている。さらに、千葉工業大学グループと共同でアプタマーの立体構造解析と塩基置換解析を行い、アプタマーの強い結合力の原理を解明し、さらに高機能なアプタマーのデザインを目指した。

### ①アプタマーを用いた白血病融合タンパク質測定系の開発

血球細胞では、正常な *MTG8* はほとんど発現しないため、*MTG8* アプタマーは *AML1-MTG8* を発現した白血病細胞の検出のためのセンサーとなる。そこで *MTG8* アプタマーについて、リアルタイム PCR による増幅という抗体にはない核酸としての長を生かした高感度な定量法を開発した。スピнкаラムを用いて *AML1-MTG8* リコンビナントタンパク質を陽イオン交換樹脂に結合し、さらに *MTG8* アプタマーを結合、溶出した。回収したアプタマーを、TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR によって定量したところ、溶出する *MTG8* アプタマーは *AML1-MTG8* タンパク質量に依存し、1ng の *AML1-MTG8* タンパク質を検出可能であった。また、正常リンパ球中で 1/10 程度の白血病細胞を検出することができた。さらに高感度化を進め、また、2種のアプタマーを組み合わせることで、血液中の微量な白血病細胞の検出系が確立できると考えられる (図 9)。現在、埼玉県立がんセンター病院血液内科と共同で、臨床サンプルを用いてこの測定系の評価を開始した。この方法はアプタマーの抗体と違った「増幅可能」である核酸の特性を生かした方法で、新しい高感度タンパク質検出法の基礎となりうる技術である。しかし、リアルタイム PCR を用いた方法は高感度であるが手間がかかる。そこで、蛍光色素を付加することが容易であるというアプタマーの特性を利用できる Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法によって *AML1-MTG8* 融合タンパク質を検出する系を作製することで、より簡便な融合タンパク質検出系の作製を開始した。FRET の場合、高感度な検出が期待できるだけでなく、この系はバイオイメージングにも即応用可能で、融合タンパク質の細胞内での局在など観察することが期待できる。また、NMR や結晶解析と歩調を合わせて、タンパク質とアプタマーの両面から変異解析を行い、構造解析を推進させた。

### ②抗 *MTG8* アプタマーの生理活性の解析

一方、抗 *MTG8* アプタマーについては、*AML1-MTG8* タンパク質の DNA 結合を阻害する活性をもつことから将来医薬となる可能性がある。そこでアプタマーが RNA であることを利用して細胞核内で発現できるように、肝炎デルタウイルスのゲノム RNA にアプタマー配列を

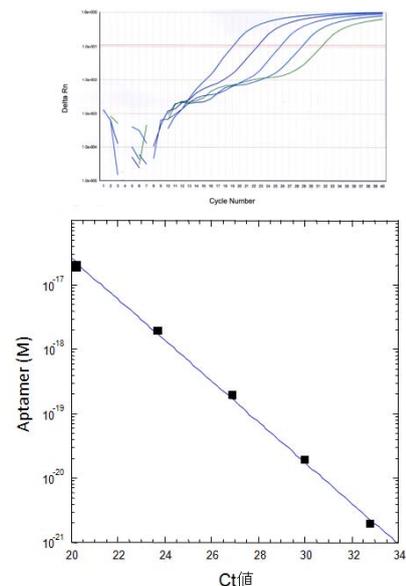


図 9. リアルタイム PCR によるアプタマーの定量  
(上) 各アプタマー濃度での増幅曲線  
(下) アプタマー濃度と Ct 値 (threshold cycle) の相関

組み込んだ発現カセットをデザインし、レンチウイルスベクターを用いて白血病細胞に導入した。しかし、ウイルス RNA の発現による免疫反応で非特異的な細胞死が誘発された。今後アプタマーの細胞内への導入法についてはさらなる開発が必要である。

### ③抗 AML1 アプタマーならびに抗 MTG8 アプタマーの塩基置換解析

抗 AML1 アプタマーは、11 塩基のヘアピン部分と 6 塩基の内部ループ部分を含むステムループ構造を形成している。千葉工大との共同研究である 11 塩基のヘアピン部分の NMR による立体構造解析によって、アプタマーが RNA にも関わらずそれが AML1 の認識する DNA モチーフに非常に近い構造を形成している事が判明した。そこで、我々は塩基置換によって、AML1 との結合機構を詳細に分析した。AML1 の認識配列に相当する G や C 塩基の置換によって、アプタマーの結合活性は失われた。特徴的な構造である A・C ミスマッチ、A のバルジアウトの置換によっても結合は著しく低下した。さらに、AML1 タンパク質の DNA を認識しているアミノ酸残基に変異を導入した場合も、AML1 アプタマーとの結合は失われた。これにより、AML1 アプタマーのヘアピン部分は、AML1 認識 DNA モチーフを擬態している事が証明できた。また、内部ループ部分の変異によっても結合活性が失われたことから、この領域も AML1 との結合に関与していることが判明した。これらの結果から、AML1 アプタマーの強い結合活性は、DNA を擬態している領域とさらに独自の内部ループ部分の双方によって獲得されていると考えられる。抗 MTG8 アプタマーについても、千葉工大グループとの共同研究による NMR による立体構造解析の結果から、4 重鎖構造を形成していることが推測された。4 重鎖構造の形成と MTG8 に対する結合機構をより詳細に調べるために、塩基置換解析を行った。4 重鎖構造を形成している G 塩基を置換すると、結合活性が失われた。それ以外にも 3 つの塩基について、置換によって結合活性が失われ、そのアプタマーの機能に重要な役割を持つことがわかった。抗 MTG8 アプタマーの結合活性には、4 重鎖構造と結合の核になる塩基が存在することが示された。

### (3) 当初の研究計画に対する現在の研究進捗状況

細胞外受容体、リガンドに対する RNA センサーおよび治療薬の開発項目に関しては、平成 19 年度から新規標的を追加し、増殖因子 MIF、FGF8、FGF23 に対するアプタマーを取得できた。これらのアプタマーに特化し、癌の診断・治療法の開発を行った。

白血病由来融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発項目では、リアルタイム PCR を用いた非常に感度の高い測定法を開発した。作出アプタマーの機能発現メカニズムの解析も、千葉工大グループとの NMR 分析とカップルして順調に進み、培養細胞を用いたアプタマーの評価も実施中した。

### (4) 新たな研究の展開

千葉工大グループとの共同研究によって、AML1 アプタマーの活性領域の一部が DNA 構造を擬態して特異的な強い結合に寄与することがわかった。このような構造 (NMR) 解析と変異体活性試験とを 'real-time' で同調させた研究は CREST 研究ならではの大きな成果であり、RNA 分子のもつ標的認識の仕組みを分子レベルから原子レベルへと理解を誘うものと期待する。

## 4. 4千葉工業大学グループ

### (1)研究のねらい

RNA アプタマーの立体構造解析と構造情報にもとづく高機能性アプタマーデザイン

千葉工業大学グループでは、RNA アプタマーの機能解析とともに構造解析を行うことにより、RNA アプタマーと標的タンパク質との相互作用メカニズムや RNA がタンパク質を擬態するメカニズムを明らかにすることを目的とした。RNA アプタマーの立体構造情報およびターゲットとの相互作用メカニズムを原子座標レベルで明らかにすることによって、計測分析用 RNA ツールの技術基盤の確立および標的分子のモジュレーター特性を生かした RNA アプタマー創薬への基盤確立を目指した。本研究では、次のアプタマーについて立体構造解析を行った。

1. ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの立体構造解析
  2. AML1 タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析
  3. MTG8 タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析
  4. aFGF タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析
  5. bFGF タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析
  6. Midkine タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析
  7. C-loop RNA モチーフに結合する RNA アプタマーの立体構造解析
  8. Cy3 に結合する RNA アプタマーの立体構造解析
- それぞれの構造解析結果について、報告する。

### (2)実施方法・実施内容・成果

#### 1. ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

NMR 法および X 線結晶構造解析法により、ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの立体構造解析を進めた。

##### ①NMR 解析

はじめに、RNA アプタマーの立体構造解析を NMR 法により行った。RNA アプタマー単独で NMR 解析を行ったところ、RNA アプタマーが内部ループ、ヘアピンループ、および2つのステムを持つ構造であることがわかった。さらに、NMR 解析を進め、立体構造決定を試みたが、内部ループ部分の柔軟性が高く、構造決定に十分な NMR 情報が得られなかったため、立体構造を決定することはできなかった。RNA アプタマー単独の立体構造は、2つのステム構造があり、それらの間にある内部ループ部分で揺らいでおり、様々なコンホメーションをとっていることが示唆された。

さらに、ヒト IgG の NMR 解析を行っている名古屋市立大学の加藤博士らとの共同研究を行い、NMR 法を用いてヒト IgG とアプタマーの相互作用を解析した。加藤博士らのグループでは、すでにヒト IgG の安定同位体標識を行い、NMR シグナルの解析が行われていた。そこで、安定同位体標識したヒト IgG 試料に RNA アプタマーを加え、NMR シグナルの化学シフト変化から、ヒト IgG のアプタマー結合部位を特定した (Miyakawa et al. RNA 2008)。RNA アプタマーは、IgG 1 分子に対して 2 つ結合し、IgG の Fc の CH2 と CH3 のヒンジ部分の近傍に結合することが示唆された。一方、アプタマーはヒト IgG にのみ特異的に結合することが明らかとなっている。NMR による相互作用解析と、マウスおよびラットの IgG の一次構造および立体構造の比較によって、ヒト IgG に特徴的な Q342 が結合に重要であることが示唆された。

## ②X 結晶構造解析

ヒト IgG の Fc 部分と RNA アプタマーの混合液を用いて、攪拌法により結晶化を試みたところ、複合体の結晶が得られた（同研究領域の大阪大学・森博士らのグループとの共同研究、Sugiyama et al. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 2008）。さらに、SPring-8 で得られた回折データを分子置換法により解析し、分解能 2.15 Å の結晶構造を得ることに成功した（図 10、Nomura et al. Nucleic Acids Res. 2010）。

アプタマーは、U6:A18:U9 で Base triple を形成し、その内部ループ部分の塩基 G8 がフリップアウトした特徴的な立体構造を形成することが明らかとなった（図 11）。アプタマーの変異体の解析から、U6 の 2'-fluoro 修飾がアプタマーと IgG との結合に重要であることが明らかとなっている。立体構造を見ると、U6 の 2'-fluoro 基と G7 の塩基の H8 の間に相互作用があることから、その fluoro 基はアプタマーの立体構造形成に重要であることが明らかとなった（図 12）。また、アプタマーの結合には、二価の金属イオンが必要であることが明らかとなっている。結晶構造では、RNA の主溝部分に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合していることから、二価の金属イオンは、複合体となるときの RNA アプタマーの構造形成に必要であることが明らかとなった（図 12）。複合体の立体構造からは、NMR 解析から Q342 がアプタマーとの結合に重要であることが示唆されていたが、結晶構造において Q342 がアプタマーと特異的に相互作用することが明らかとなった（図 13）。さらに、フリップアウトしたアプタマーの G8 は、IgG の Y373 とスタッキング相互作用をしている。アプタマーはヒト IgG に対して高い親和性をもつが、その結合面は狭いことが明らかとなっている。

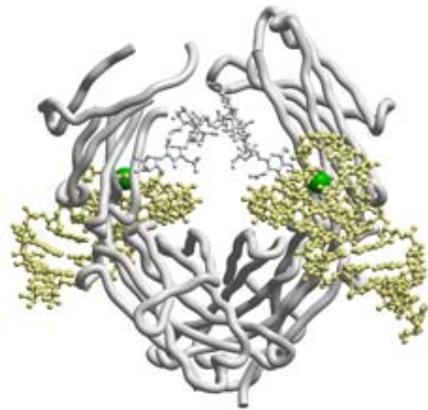


図 10 ヒト IgG-Fc と RNA アプタマーの複合体の立体構造

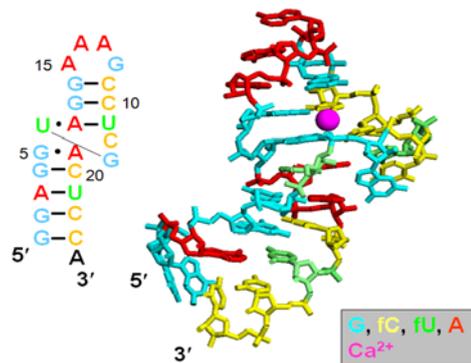


図 11 RNA アプタマーの立体構造

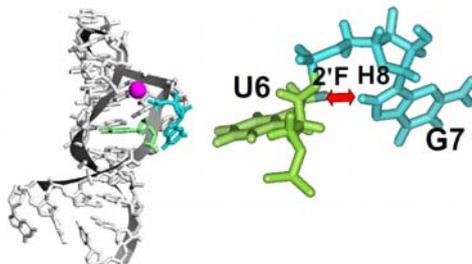


図 12 U6 の 2'-fluoro 基と G7 の塩基の H8 の間に相互作用

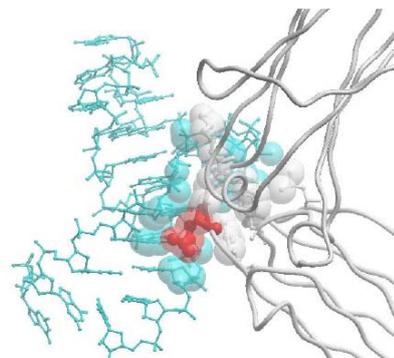


図 13 IgG と RNA アプタマーの相互作用 Q342 を赤で示す。

### ③成果の位置づけや類似研究との比較

国際的には、これまで3種類のアプタマーと標的タンパク質の複合体の X 線結晶構造が発表されている (thrombin, MS2 coat protein, NF- $\kappa$ B)。これらはいずれも、RNA の負電荷とタンパク質の正電荷との電気的な相互作用をメインな結合力とするものである。しかし、今回の我々の構造解析の結果から、RNA アプタマーが IgG の中性アミノ酸領域に結合することが明らかとなった (図 14)。RNA アプタマーと IgG の相互作用面の相補性が非常に高く、数多くの弱い結合 (水素結合やファンデルワールス力) を使って、RNA アプタマーが IgG に結合していることが示唆された。この結果は、RNA が電荷相互作用に依存せずに特異的な強い結合を達成できる事を証明した世界初の報告である。

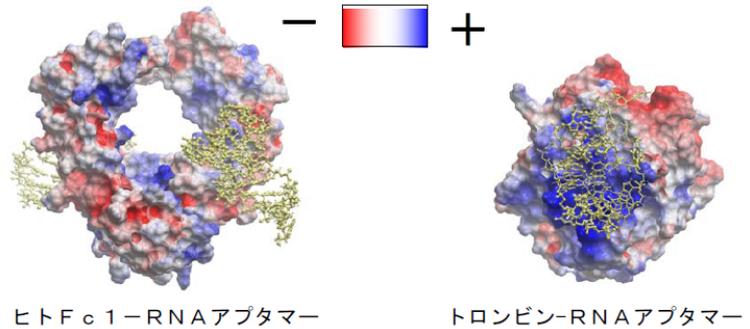


図 14 タンパク質の表面にプラス(青)とマイナス(赤)の静電気を表示させた。RNAアプタマーは黄色のスティックで表している。トロンビンではタンパク質のプラスに帯電した部分にRNAアプタマーが相互作用しているのに対して、ヒトFcとの相互作用部位にはそのような電荷の偏りは見られない。

また今回、IgG の立体構造は、RNA アプタマーが結合する前と結合した後で、ほとんど構造変化していないことが明らかとなった (図 15)。一方、NMR 解析から RNA アプタマーは柔軟な構造であることがわかっており、RNA アプタマーが induced fit してタンパク質と結合していることが示唆された。以上のことから、RNA アプタマーが自身の持つしなやかな造形力を利用して標的タンパク質の形に合わせた構造を作り出していることによって、タンパク質と強く結合していると考えられる。また、この RNA アプタマーは二価のイオンを用いることで、その構造形成をコントロールできることが可能である。RNA アプタマーの構造は非常に柔軟であるが、タンパク質と結合することによってしっかりとフォールドする。さらに、その結合をカルシウムイオンの添加と除去によって繰り返しコントロールすることができることから、我々は”RNA plasticity” というコンセプトを確立するに至った。

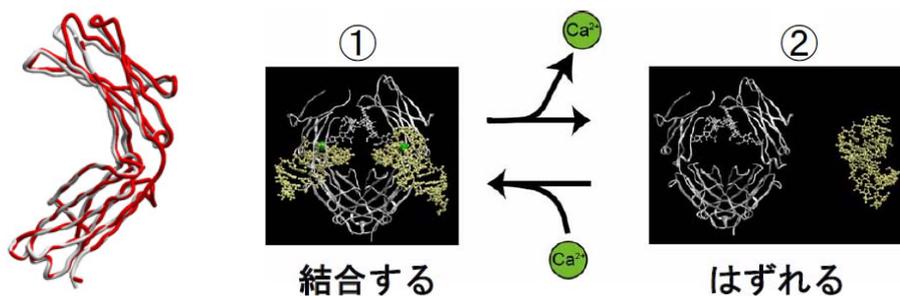


図 15 RNA アプタマーの結合による IgG の構造変化(左)。結合前(白)と結合後(赤)。カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ )を用いたRNAアプタマーの活性コントロール(右)。

## 2. AML1 タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

### ①NMR 解析

はじめに、NMR 法により RNA アプタマーの二次構造を解析したところ、RNA アプタマーが A:C ミスマッチ塩基対、A のバルジ残基、および内部ループ部分を持つヘアピン型構造であることがわかった (図 16a)。さらに、SELEX 法により得られたすべての RNA アプタマーの配列を解析し、二次構造を予測したところ、すべての RNA アプタマーにおいて共通のモチーフが保存されていることがわかった (図 16b)。埼玉県立がんセンターの神津博士らのグループにより、このモチーフに変異を導入したところ、AML1 タンパク質との結合力が著しく低下した。従って、このモチーフが AML1 タンパク質との結合に重要であることが明らかとなった。

さらに、NMR 法により、モチーフを含む部分構造の立体構造解析を行った。その結果、RNA アプタマーは、モチーフ部位において A:C 塩基対および C:G:A の Base triple を形成することが明らかとなった (図 17)。

また、AML1 タンパク質が標的 DNA に結合するアミノ酸残基はすでに明らかとなっている (図 18a)。今回、これらのアミノ酸をアラニン残基に置換した変異体を用いて RNA アプタマーの結合能を調べたところ、アプタマーの結合力は著しく低下した。従って、RNA アプタマーは、標的 DNA と同様に AML1 タンパク質と相互作用していることが示唆された。さらに、標的 DNA と RNA アプタマーの二次構造を比較すると、

結合に関わるヌクレオチドの位置は一致している (図 18a, b)。そして興味深いことに、これらの結合に関わるヌクレオチドの位置を、RNA アプタマーと二重鎖 DNA、RNA アプタマーと二重鎖 RNA の両者の立体構造上で比較したところ、RNA アプタマーと二重鎖 DNA でよく一致した (図 18c, d)。従って、RNA アプタマーは A:C ミスマッチ塩基対および Base triple を導入することによって、DNA の構造を擬態していることが示唆されたのである。RNA の二重らせんは、A 型らせんと呼ばれ、主溝が狭くて深い。一方、DNA の二重らせんは B 型らせんと呼ばれ、主溝が広くて浅い。RNA アプタマーの持つ A:C ミスマッチ塩基対および Base triple によって、B 型らせんのように主溝が広がったと考えられる (論文投稿中)。

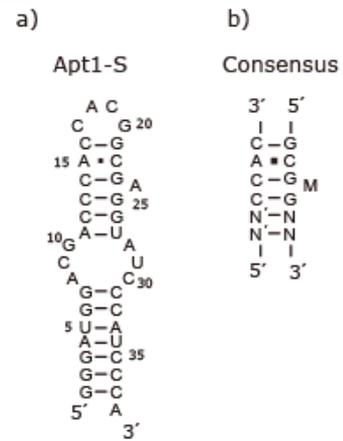


図 16 RNA アプタマーの二次構造  
a)RNA アプタマー  
b)共通配列

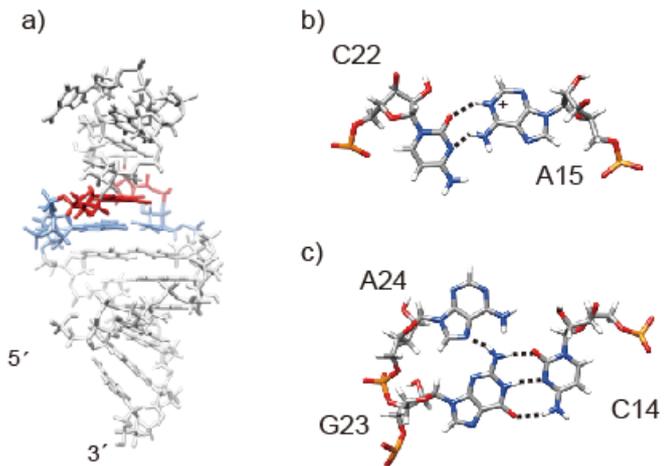


図 17 アプタマーの立体構造  
a)Apt1-S2 の全体構造。A:C 塩基対を赤、base triple を青で示している。  
b) A:C 塩基対  
c) C:G:A の Base triple

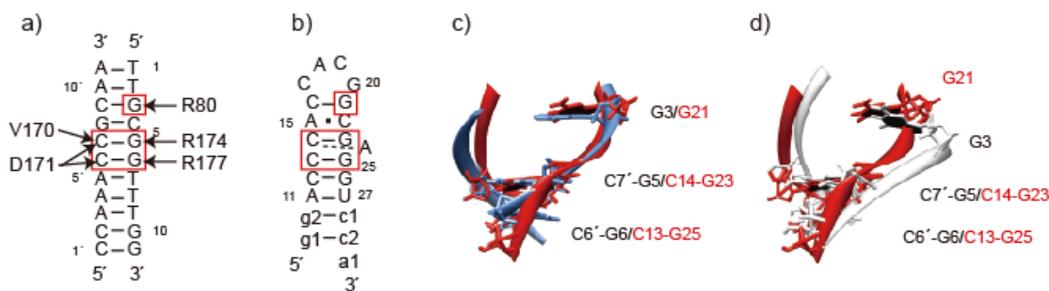


図 18 アプタマーと基質 DNA の二次構造および立体構造の比較  
 a) 基質 DNA の二次構造。認識に重要な残基を赤で示し、結合にかかわるアミノ酸を表示  
 b) アプタマーの二次構造。DNA と同様に重要な残基を赤で示した。  
 c) アプタマー (赤) と DNA (青) の構造の比較  
 d) アプタマー (赤) と RNA (白) の構造の比較

## ②X 結晶構造解析

さらに現在、同研究領域の森博士のグループと共同で、RNA アプタマーと AML1 タンパク質の複合体の X 線結晶構造解析を行っている。複合体の結晶化に成功しており、解析を進めている。

## ③成果の位置づけや類似研究との比較

DNA 結合タンパク質である NF- $\kappa$ B に結合する RNA アプタマーの立体構造解析は行われている。そのアプタマーは、本来 NF- $\kappa$ B が結合する DNA 配列とは全く異なる配列を持っているが、今回の我々の研究成果と同様に、アプタマーのらせん構造の主溝が広がり、その広がった主溝部分に NF- $\kappa$ B が結合することが明らかとなっている。本研究で構造解析した RNA アプタマーは、AML1 タンパク質が認識する DNA の塩基を保持しており、A:C ミスマッチ塩基対および Base triple を導入するだけで DNA を擬態できることを示した初めての結果である。

## 3. MTG8 タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

MTG8 に結合する RNA アプタマーの NMR スペクトルを測定したところ、10~11.5 ppm の付近にワトソクリック型塩基対を形成していない G および U のイミノプロトンに由来するシグナルが観測された。さらに、NOESY スペクトルを測定したところ、これらのシグナルの間に強い NOE が観測された。

これは、G の四重鎖構造に特徴的な NMR シグナルである (図 19)。さらに、この四重鎖構造はカリウムイオンに依存して構造形成していることがわかった。

一方、埼玉県立がんセンターの神津博士らのグループにより、RNA アプタマーの G 残基を他の塩基に置換すると、MTG8 タンパク質に対する親和性が大幅に減少することが明らかとなっている。従って、RNA アプタマーは四重鎖構造を形成して、MTG8 タンパク質に結合していることが示唆された (図 20、投稿論文作成中)。

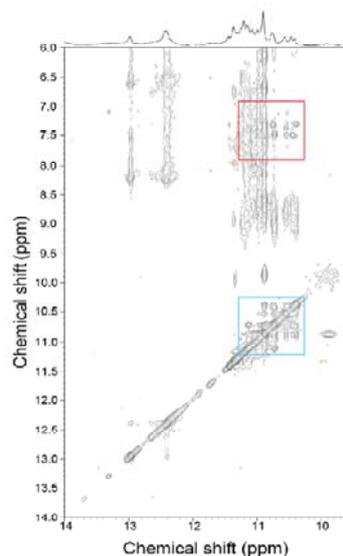


図 19 RNA アプタマーの NOESY スペクトル

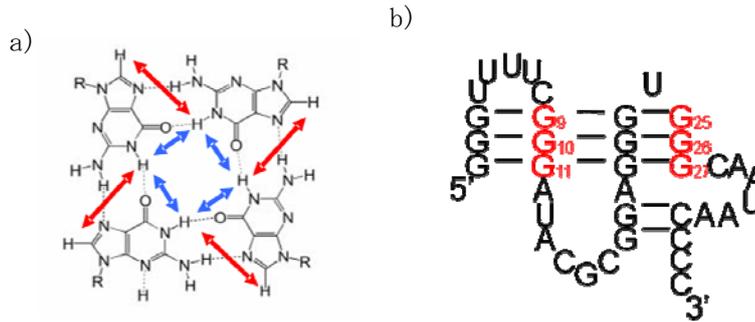


図 20 RNA アプタマーの四重鎖構造  
 (a) G の四重鎖構造で観測される NOE (矢印)  
 (b) 予測される四重鎖構造と、変異導入によって活性が低下した残基 (赤)

#### 4. aFGF タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

NMR 法を用いて RNA アプタマーの二次構造を解析した。また、aFGF との相互作用により、RNA アプタマーの構造が大きく変化することが示唆された。さらに  $^{15}\text{N}$  標識した aFGF を用いて RNA アプタマーの相互作用部位を調べた結果、ヘパリン結合部位近傍に RNA アプタマーが結合することが示唆された。

#### 5. bFGF タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

RNA アプタマーの NMR 法による解析を行うとともに、RNA アプタマーと bFGF の複合体の X 線結晶構造解析を同研究領域の森博士のグループと共同で進めている。

#### 6. Midkine タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

RNA アプタマーの NMR 法解析を行ったところ、カリウムイオン依存的に四重鎖構造を形成することがわかった。さらにアプタマーの末端にコレステロールを結合させることによって、カリウムイオンが存在していなくても G の四重鎖構造を形成していることが確認された。現在、Midkine タンパク質と RNA アプタマーの複合体について、X 線結晶構造解析を試みている。

#### 7. C-loop RNA に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

RNA アプタマーの分子量が大きいため、NMR 法によって立体構造解析をするには、RNA アプタマーの断片化が必要であると考えた。RNA アプタマーを断片化したところ、結合活性を失い、NMR 解析が困難であると考えた。

#### 8. Cy3 に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

RNA アプタマーの NMR スペクトルを測定し、イミノプロトンシグナルの解析を行った。イミノプロトンシグナルは非常にブロードであり、立体構造を解析することは困難であった。しかし、RNA アプタマーの試料に Cy3 を加えたところ、NMR シグナルの変化したことから、RNA アプタマーと Cy3 の相互作用を確認することができた。

### (3) 当初の研究計画に対する現在の研究進捗状況

#### 1) ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

現在、立体構造情報をもとに、さらに親和性が高い RNA アプタマーの作成を試みてい

る。X線結晶構造解析の結果、RNA アプタマーは非常に柔軟であり、IgG の結合面に induced fit して結合していることが明らかとなっている。これは、「しなやかさ」を利用した RNA アプタマーの相互作用の特徴であるが、アプタマーのみで IgG と結合する形を形成させることができれば、さらに高い親和性が得られることが予想される。一方で、RNA アプタマーのリボースのパッカリングは、全て C3'-endo 型であることが明らかとなっている。そこで、リボースのパッカリングを C3'-endo 型に固定する Locked Nucleic Acid (LNA) を導入することによって、高親和性の RNA アプタマーが得られると考えた。実際に、LNA を導入した RNA アプタマーを作成し、親和性が高くなった変異体の作成に成功している。今後は、IgG に結合した RNA アプタマーのコンホメーションを固定する修飾を複数個所に導入することによって、さらに親和性が高い RNA アプタマーの作成を試みる予定である。また、ヒト IgG とアプタマーの複合体の立体構造解析の結果、とても狭い領域で相互作用していることが明らかとなった。また、現在、等温滴定型カロリメトリーを用いて、アプタマーの高親和性の原因について解析を試みたが良好な結果は得られていない。今後も、アプタマーの高親和性の原因を物理化学的に解明することを計画している。

## 2) AML1 タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

現在、立体構造情報をもとに、さらに親和性が高い RNA アプタマーの作成を試みている。SELEX の結果、数種類の RNA アプタマーが得られており、それらのアプタマーはすべて共通のモチーフを持っていた。アプタマーと AML1 タンパク質との主な結合部位は共通モチーフの構造であり、DNA の構造を擬態していることが明らかとなっている。一方、RNA アプタマーの変異体の解析から、これらのアプタマーは DNA を擬態する結合部位の他に補助的に AML1 タンパク質と結合する部分があることが明らかとなっている。そこで、これらのアプタマーについて共通モチーフを中心とし、キメラ体を作成することによって、親和性が高い RNA アプタマーの作成を試みる予定である。

## (4) 新たな研究の展開

### 1) ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

一般的な RNA とタンパク質との相互作用では、RNA の主鎖のリン酸基と塩基性のアミノ酸による静電的な相互作用が主となるが、IgG アプタマーの場合、静電的な相互作用が少ないことが示唆された。これは、RNA アプタマーとタンパク質の相互作用が、核酸とタンパク質の相互作用というより、タンパク質とタンパク質の相互作用に近いことを示唆しており、RNA アプタマーによるタンパク質の擬態という概念を支持するものである。さらに、これまで標的とされなかったタンパク質に対して、RNA アプタマーを作りだし、コントロールできる可能性が示され、今後、医薬や工業に RNA アプタマーが広く利用されることが期待される。

### 2) AML1 タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

現在、立体構造情報をもとに、さらに親和性が高い RNA アプタマーの作成を試みている。SELEX の結果、数種類の RNA アプタマーが得られており、それらのアプタマーはすべて共通のモチーフを持っていた。アプタマーと AML1 タンパク質との主な結合部位は共通モチーフの構造であり、DNA の構造を擬態していることが明らかとなっている。一方、RNA アプタマーの変異体の解析から、これらのアプタマーは DNA を擬態する結合部位の他に補助的に AML1 タンパク質と結合する部分があることが明らかとなっている。そこで、これらのアプタマーについて共通モチーフを中心とし、キメラ体を作成する

ことによって、親和性が高い RNA アプタマーの作成を試みる予定である。

本研究結果は、RNA が DNA の構造を簡単に擬態できることを示している。つまり、Base triple やミスマッチ塩基対を導入するだけで、RNA の主溝が広がり、DNA と同じ構造になる。これは、DNA 結合タンパク質をターゲットとする際に、DNA の構造を真似た RNA 医薬品を論理的にデザインすることが可能であることを示唆している。RNA 医薬品の開発のみでなく、転写発現制御の方法として応用できると考えられる。

さらには、近年、生命科学の「暗黒問題」として浮上した Noncoding RNA 研究にも、RNA のもつ潜在力の理解を通じて、大きな貢献が期待される。実際に、RNA アプタマーと同じ構造モチーフをとりうる配列がゲノム上にあることを埼玉県立がんセンターの神津博士らは発見しており、ゲノムから転写された RNA が AML1 タンパク質と結合することを明らかにすれば、Noncoding RNA による新しい転写発現制御のメカニズムの発見になる。そして、機能未知の Noncoding RNA の解析が急速に進むことが期待される。

## § 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 23 件)

1. Sakamoto, T., Oguro, A., Kawai, G., Sonenberg, N., Ohtsu, T., Nakamura, Y. (2005) NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A. *Nucl. Acids Res.*, 33: 745-754.
2. Mochizuki, K., Oguro, A., Ohtsu, T., Sonenberg, N., Nakamura, Y. (2005) High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding and inhibits translation. *RNA*, 11: 77-89.
3. Ohuchi, S.P., Ohtsu, T., Nakamura, Y. (2005) A novel method to generate aptamers against recombinant targets displayed on the cell surface. *Nucl. Acids Symp. Series*, 49: 351-352.
4. Ohuchi, S.P., Ohtsu, T., and Nakamura, Y. (2006) Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface. *Biochimie*, 88: 897-904.
5. Miyakawa, S., Oguro, A., Ohtsu, T., Imataka, H., Sonenberg, N., Nakamura, Y. (2006) RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *RNA*, 12:1825-1834.
6. Ohuchi, S.P. and Nakamura, Y. (2007) Slight sequence modifications unexpectedly alter the metal-dependency of a kissing-loop interaction. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 51: 395-396.
7. Tanaka, Y., Akagi, K., Nakamura, Y., Kozu, T. (2007) RNA aptamers targeting the C-terminal of KRAS oncoprotein generated by an improved SELEX with isothermal RNA amplification. *Oligonucleotides*, 17, 12-21.
8. Ohuchi, S.P., Ikawa Y., and Nakamura, Y. (2008) Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. *Nucl. Acids Res.*, 36: 3600-3607.
9. Yamamura, Y., Lee, W. L., Goh, M. X., and Ito, Y. (2008) Role of TAp73a in induction of apoptosis by transforming growth factor-b in gastric cancer cells. *FEBS Lett* 582:2663-2667, 2008.
10. Wang, J., Takeuchi, H., Jin S., Sonobe Y., Shijie, J., Mizuno, T., Miyakawa, S., Fujiwara, M., Nakamura, Y., Kato, T., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Suzumura, A. (2008) Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 3915-3920.
11. Miyakawa, S., Nomura, Y., Sakamoto, T., Yamaguchi, Y., Kato, K., Yamazaki, S., Nakamura, Y. (2008) Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. *RNA*, 14:1154-63.

12. Sugiyama S., Nomura Y., Sakamoto T., Kitatani T., Kobayashi A., Miyakawa S., Takahashi Y., Adachi H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Nakamura Y., Matsumura H. (2008) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of an RNA aptamer in complex with the human IgG Fc fragment. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 64: 816-818.
13. Nakamura Y., Endo K., Adachi H., & Ishiguro A. (2009) RNA aptamers to translational components. *Mol. Biopl. Trans. Sci.* 90: 369-394.
14. Oguro, A., Ohtsu, T., Nakamura, Y. (2009) Aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eIF4A. *Anal. Biochem*, 388: 102-107.
15. Kanai, A., Sato, A., Fukuda, Y., Okada, K., Matsuda, T., Sakamoto, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Kawai, G., and Tomita, M. (2009) Characterization of a heat-stable enzyme possessing GTP-dependent RNA ligase activity from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *RNA*, 15:420-431.
16. Watanabe, Y., Nakamura, Y., Ito, K. (2010) A novel class of bacterial translation factor RF3 mutations suggests specific structural domains for premature peptidyl-tRNA drop-off. *FEBS Lett.*, 584: 790-794.
17. Endo, K., Nakamura, Y. (2010) A binary Cy3 aptamer probe composed of folded modules. *Anal. Biochem.*, 400: 103-109.
18. Hiep, H.M., Saito, M., Nakamura, Y., Tamiya, E. (2010) RNA aptamer-based optical nanostructured sensor for highly sensitive and label-free detection of antigen-antibody reactions. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396: 2575-81.
19. Nomura Y., Sugiyama S., Sakamoto T., Miyakawa S., Adachi H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Nakamura Y., Matsumura H. (2010) Conformational plasticity of RNA for target recognition as revealed by the 2.15 Å crystal structure of a human IgG-aptamer complex, *Nucleic Acids Res.*, 38: 7822-7829.
20. Ishiguro, A., Akiyama, T., Adachi, H., Inoue, J., Nakamura, Y. (2011) Therapeutic potential of anti-interleukin-17A aptamer: Suppression of IL-17A signaling and attenuation of autoimmunity in mouse models. *Arthritis Rheum.*, 63: 455-466.
21. Nakamura, Y., Ito, K. (2011) tRNA mimicry in translation termination and beyond. *WIREs RNA*, in press.
22. Nakamura, Y. (2011) Aptamer: Biology to Applications. *Advances in Polymer Science*, in press.
23. Adachi, H., Ishiguro, A., Hamada, M., Sakota, E., Asai, K., Nakamura, Y. (2011) Antagonistic RNA aptamer specific to a heterodimeric form of human interleukin-17A/F. *Biochimie*, in press.

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

1. 大内将司、中村義一：人工的な機能性核酸分子の創出、臨床化学、 34: 197-204 (2005)
2. 中村義一：RNA 入門、「RNA 工学の最前線」(中村義一・大内将司 監修)、シーエムシー出版、1-6 (2005)
3. 大内将司：アプタマー概論、「RNA 工学の最前線」(中村義一・大内将司 監修)、シーエムシー出版、139-154 (2005)
4. 和田猛、宮川伸：核酸医薬の安定化戦略、「RNA 工学の最前線」(中村義一・大内将司 監修)、シーエムシー出版、238-249 (2005)
5. 藤原将寿、宮川伸、中村義一：アプタマー創薬の現状、MEDCHEM NEWS、16:13-16 (2006)
6. 藤原将寿、宮川伸、中村義一：アプタマー医薬品、BIO Clinica、21: 725-729 (2006)
7. 藤原将寿、宮川伸、中村義一：核酸創薬、バイオテクノロジージャーナル、6: 650-654 (2006)
8. 藤原将寿、宮川伸、中村義一：アプタマー創薬、ファルマシア、42: 1232-1236 (2006)
9. 田中陽一郎、神津知子：機能性 RNA の医学応用、蛋白質核酸酵素、51, 14, 2235-2237

(2006)

10. 中村義一：桧舞台に躍り出た RNA、「RNA と生命」(中村義一編集)、蛋白質核酸酵素、51: 2409-2412 (2006)
11. 宮川伸、藤原将寿、中村義一：アプタマー医薬、「RNA と生命」(中村義一編集)、蛋白質核酸酵素、51: 2521-2527 (2006)
12. 中村義一：RNA は擬態する、科学、76: 500-506 (2006)
13. 中村義一：RNA 科学概論、遺伝子医学 MOOK 「RNA と創薬」(中村義一 監修)、メディカルドゥ、23-30 (2006)
14. 中村義一：RNA 抗体としてのポテンシャル、遺伝子医学 MOOK 「RNA と創薬」(中村義一 監修)、メディカルドゥ、39-46 (2006)
15. 大内将司：アプタマー工学、遺伝子医学 MOOK 「RNA と創薬」(中村義一 監修) メディカルドゥ、32-38 (2006)
16. 大内将司：リボザイム・テクノロジー、遺伝子医学 MOOK 「RNA と創薬」(中村義一 監修)、メディカルドゥ、143-151 (2006)
17. 望月潔隆、小黒明広、中村義一：翻訳開始因子 (e1F) の異常による癌化と創薬、遺伝子医学 MOOK 「RNA と創薬」(中村義一 監修)、メディカルドゥ、195-201 (2006)
18. 大内将司：構造体として機能する RNA. 実験医学、24: 800-804 (2006)
19. 中村義一、大内将司：RNA と疾患、分子細胞治療、5: 391-392 (2006)
20. 坂本泰一、河合剛太 (2006) 機能性 RNA 分子の構造と機能の解析、「機能性 Non-coding RNA (河合剛太、金井昭夫編)」, p145-159, クバプロ
21. 遠藤慧、中村義一：SPR を用いたタンパク質-核酸相互作用の解析法、実験医学「実験ハンドブックシリーズ」羊土社、pp 205-209 (2007)
22. 阿部智行、山崎聡子、中村義一：アプタマーを用いたバイオセンサー、「バイオセンサーの先端科学技術と応用」(民谷栄一 監修)、シーエムシー出版、52: 54-64 (2007)
23. 宮川伸、藤原将寿、中村義一：アプタマー創薬、放射線生物研究、42: 312-328 (2007)
24. 山崎聡子、阿部智行、中村義一：機能性 RNA アプタマーの医療分野への展開、ケミカルエンジニアリング、52: 527-533 (2007)
25. 金玲、藤原将寿、中村義一：RNA 医薬、「RNA 研究の新知見と医療応用への展望」(林崎良英、安田純編)、実験医学、26: 1651-1656 (2008)
26. 石川百合子、藤原将寿、中村義一：RNA アプタマーの医薬品応用、炎症と免疫、16:627-633 (2008)
27. 岩川外史郎、中村義一：RNA アプタマーの開発と医薬品への応用、Medical Science Digest、in press (2008)
28. 宮川伸、藤原将寿、西山道久：RNA アプタマーを用いた分子標的医薬開発 Drug Delivery System 23:534-543 (2008)
29. 坂本泰一、河合剛太 (2009) 核酸の NMR、「核磁気共鳴分光法 (日本分光学会編)」, pp. 99-132, 講談社サイエンティフィック
30. 大内将司：SELEX 法による RNA アプタマーの取得。「無敵のバイオテクニカルシリーズ・RNA 実験ノート 上巻」(稲田利文・塩見春彦 編集) 羊土社、160-166 (2008)
31. 大内将司：アプタマーの探索と応用. 生物工学会誌、87: 277-279. (2009)
32. 青木一晃、藤原将寿、宮川伸、中村義一：RNA アプタマーの分子標的薬への応用 Medical Science Digest 35:578-581 (2009)
33. 藤原将寿：自己免疫疾患に対するアプタマー医薬の探索研究 遺伝子医学 MOOK 15: 162-166 (2009)
34. 宮川伸：RNA アプタマー創薬と世界の動向 遺伝子医学 MOOK 15: 157-161 (2009)
35. 中村義一：RNA の造形力を利用した創薬、現代化学、11月号、No. 464、pp. 55-61 (2009)

36. 藤原将寿、宮川伸、西山道久、中村義一：アプタマー、「核酸医薬の最前線」(和田猛 監修)、シーエムシー出版、p. 162-175 (2009)
37. 遠藤慧、中村義一：アプタマー、「かたち」を創る RNA、Cytometry Research、19: 1-7 (2009)
38. 藤原将寿、宮川伸、中村義一：核酸創薬の開発状況、「分子標的薬開発への挑戦」(岡野栄之ら編)、実験医学、27: 791-797 (2009)
39. 金玲、中村義一：新しいRNA 医薬 miRNA と RNA アプタマー、Bio Clinica、24: 55-61 (2009)
40. 岩川外史郎、中村義一：RNA アプタマーの開発と医薬品への応用、Medical Science Digest、35: 5-6 (2009)
41. 石黒亮：新素材としての RNA (抗体を代替する特性) . 遺伝子医学 MOOK 「最新 RNA と疾患研究」(中村義一 監修)、メディカルドゥ、53-58 (2009)
42. 中村義一：2009年ノーベル化学賞、苦渋の結論、実験医学、12月号、27:311 2-3113(2009)
43. 池田寿子、宮川伸、藤原将寿：RNA テクノロジーによる創薬：アンチセンス、siRNA, miRNA, および RNA アプタマー 医薬ジャーナル社 新薬展望 増刊号 46 S-1:44-51 (2010)
44. 石黒亮、石川百合子、中村義一：核酸医薬品-その原理と応用-. 遺伝子診療学 (第2版)、日本臨牀、590-594(2010)
45. 中村義一：2009年ノーベル化学賞、Ribosome World War、蛋白質核酸酵素、55: 108-113 (2010)

#### 著書

田原総一郎、中村義一：RNA ルネッサンスー遺伝子新革命、医薬経済社 (2006)

#### (3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

①招待講演 (国内会議16件、国際会議 14件)

##### 国内会議

- 1 中村義一：RNAと創薬、第65回日本癌学会学術総会シンポジウム、2006年9月28-30日(横浜)
- 2 Nakamura, Y.: Antibody equivalent RNA. 第11回慶応医学賞受賞記念シンポジウム、2006年11月2日(東京)
- 3 中村義一：多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発、第57回医用高分子研究会、2007年3月7日(東京)
- 4 中村義一：アプタマーRNA 医薬の基礎、現状、将来、第9回癌治療増感研究シンポジウム、2007年2月10-11日(奈良)
- 5 中村義一：「かたち」を創る RNA ー基礎から創薬へー、国際バイオ EXPO&フォーラム特別講演、2007年6月21日(東京)
- 6 中村義一：分子擬態から RNA 創薬へ(シンポジウム講演)、BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)、2007年12月11-15日(横浜)
- 7 中村義一：「かたち」を創る RNA:基礎から創薬へ、放射線影響学会第50回大会(招待講演)、2007年11月11-14日(幕張)
- 8 中村義一：「かたち」を創る RNA:基礎から創薬へ、水谷糖質科学振興財団設立15周年記念講演会、2007年10月29日(東京)
- 9 中村義一：RNAは化ける:基礎から創薬へ、第23回Wakoワークショップ(招待講演)、2007年1月16日(東京)
- 10 中村義一：「かたち」を創る RNA の新展開、第24回日本 DDS 学会年会、2008年6月29-30日(東京)
- 11 中村義一：アプタマーRNA 医薬、第16回日本臨床化学会関東支部総会、2008年6月28日

(東京)

- 12 中村義一: RNA 科学と創薬、第15回日本遺伝子診療学会大会、2008年7月31～8月2日(仙台)
- 13 中村義一: アプタマー、「かたち」を創る RNA、第18回日本サイトメトリー学会術集会、2008年6月29日(東京)
- 14 坂本泰一: 核酸の NMR、日本分光学会第 45 回夏期セミナー、2009年9月3日(千葉)
- 15 中村義一: RNA の造形力を利用した創薬、日本薬学会第130回年会シンポジウム、2010年3月28～30日(岡山)
- 16 中村義一: RNA の造形力と創薬、CBI 学会第307回研究講演会、2010年4月12日(東京)

#### 国際会議

- 1 Nakamura, Y.: Aptamer as RNA-made super antibody for basic and therapeutic applications. Manchester Interdisciplinary Biocentre Symposium, Manchester, October 26, 2006
- 2 Nakamura, Y.: Aptamer as RNA-made super-antibody: basics and therapeutic potential. The 8th International Engelhardt Conference on Molecular Biology "RNA-Protein Interaction", Moscow Region, August 19-24, 2006
- 3 Nakamura, Y.: Aptamer as RNA-made super-antibody for therapeutics. 9th International Conference "Drug and Gene-based Therapeutics", Crete, September 2-8, 2006
- 4 Nakamura, Y.: Aptamer as RNA-made super-antibody for therapeutics. A-IMBN Delivery Symposium on Genomics, Kathmandu, March 5-6, 2007
- 5 Nakamura, Y.: RNA as a structure-creating material: fundamentals to therapeutics. Second International Conference on Development of Biomedical Engineering in Vietnam 2007, July 25-28, 2007, Hanoi
- 6 Nakamura, Y.: RNA aptamer: fundamentals to therapeutics. Avison Biomedical Symposium 2008, January 17, 2008 (Yonsei University College of Medicine, Seoul)
- 7 Nakamura, Y.: RNA-protein mimicry and RNA aptamer therapeutics, FEBS Advanced Lecture Course, "New Developments in Quantitative Molecular Bioscience", September 10-18, 2008 (Spetses, Greece, Organized)
- 8 Nakamura, Y.: RNA: Biology to Therapeutics. IBC's 1<sup>st</sup> Annual Asia TIDES, February 23-25, 2009 (Tokyo)
- 9 Nakamura, Y.: Novel view of RNA 'Omics'. 3<sup>rd</sup> Regional Conference on Molecular Medicine. May 2-4, 2009 (Kota Bharu, Malaysia)
- 10 Nakamura, Y.: RNA plasticity and aptamer therapeutics, AIMECS09, August 23-28, 2009 (Cairns)
- 11 Nakamura, Y.: RNA Plasticity and Aptamer Therapeutics, Joint Symposium of the 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19<sup>th</sup> Antisense Symposium, November 3-6, 2009 (Fukuoka)
- 12 Nakamura, Y.: RNA Plasticity and Biomedical Applications of Aptamers, BBSRC Conference on Evolution and Design of Biomolecular Systems, October 18-21, 2009 (Mallorca, Spain, Organized)
- 13 Nakamura, Y.: RNA-protein mimicry and RNA aptamer therapeutics, FEBS Advanced Lecture Course, "Analysis and Engineering of Biomolecular Systems", September 11-17, 2010 (Spetses, Greece, Organized)
- 14 Nakamura, Y.: Conformational Plasticity of RNA and Therapeutic Aptamers to Midkine and Interleukin 17, POSTEC International Symposium on "Aptamer as an emerging technology for biomedical application", December 1, 2010 (Pohang)

#### ②口頭発表 (国内会議9件、国際会議2件)

- 1 Nakamura, Y.: RNA antibodies to translation initiation factors eIF4E, eIF4G, eIF1A and eIF4A. Jacques-Monod Conference "Multiple functions of RNA in gene regulation", Roscoff (France), May 3-7, 2006

- 2 Miyakawa, S. (Ribomic Inc), Nakamura, Y.: High specificity RNA aptamer to human immunoglobulin G: fundamental characters and application to affinity resin. RNA 2006 Izu symposium on "Functional RNAs and Regulatory Machinery", Ohito, December 3-7, 2006
- 3 坂本泰一、小黒明弘、河合剛太、大津 敬、中村義一: 翻訳開始因子 eIF4A に結合する aptamer の2つのヘアピン部分の立体構造。第45回NMR討論会、京都、2006 年11月22-24日
- 4 小黒明弘、中村義一: RNA aptamer を用いた eIF1A の機能解析、第8回 RNA ミーティング(日本 RNA 学会年会)、2006 年7月18-20日(淡路)
- 5 大内将司<sup>a</sup>、井川善也<sup>b</sup>、中村義一<sup>a</sup>(<sup>a</sup>東大・医科研、<sup>b</sup>九大・院工)人工リガーゼ・リボザイムをもちいた RNA-RNA 相互作用の選別システム、第9回 RNA ミーティング、2007 年7月28-31日(名古屋)
- 6 Yasuko Yamamura, Akihiro Oguro, Koichi Ito, Yoshikazu Nakamura: Interaction of Smad with Eukaryotic Translation initiation Factors 4A and 4G. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年10月3-5日
- 7 野村祐介、宮川 伸、山崎聡子、猪股恵美礼、山口芳樹、加藤晃一、松村浩由、杉山成、森 勇介、坂本泰一、中村義一: ヒト IgG および抗体医薬品の精製に利用できる RNA aptamer の高い特異性の構造基盤。第10回 RNA ミーティング、札幌、2008 年7月23-25日
- 8 小黒明弘、中村義一: RNA aptamer を利用した細胞破碎液中の標的タンパク質検出法の確立、第10回 RNA ミーティング、2008 年7月23-25日(札幌)
- 9 Yamamura Y, Nakamura Y: An RNA aptamer targeting the TGF- $\beta$  type II receptor inhibits TGF- $\beta$  signaling. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1-3日(横浜)
- 10 石黒亮、秋山泰身、井上純一郎、中村義一: 抗インターロイキン17 aptamer による自己免疫疾患抑制の分子機構、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9-12日(横浜)
- 11 石黒亮、秋山泰身、足立宏典、井上純一郎、中村義一: 自己免疫疾患モデルマウスを用いた RNA aptamer によるインターロイキン 17 の機能制御、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7-10日(神戸)

③ポスター発表 (国内会議 31 件、国際会議18 件)

国内会議

1. 福永淳一、田中陽一郎、赤木究、中村義一、神津知子: MTG8 の TAF domain に結合する RNA aptamer の創製、第8回日本 RNA 学会年会、2006 年7月18-20日(淡路)
2. 足立大典、小黒明弘、中村義一: 酵母細胞内での抗 eIF4E aptamer 発現と生育抑制効果、第9回日本 RNA ミーティング(日本 RNA 学会年会)、2007 年7月28-31日(名古屋)
3. 遠藤慧、小黒明弘、中村義一: eIF4AIII に特異的に結合する RNA aptamer の取得とその機能評価、第9回日本 RNA ミーティング(日本 RNA 学会年会)、2007 年7月28-31日(名古屋)
4. 野村祐介、富士原和也、千葉学、飯淵宏昭、田中卓、田中陽一郎、福永淳一、神津知子、中村義一、河合剛太、坂本泰一: AML1 Runt domain に結合する RNA aptamer の構造解析。第46回 NMR 討論会、札幌、2007 年9月11-13日
5. 飯淵宏昭、野村祐介、富士原和也、千葉学、田中卓、田中陽一郎、福永淳一、神津知子、中村義一、河合剛太、坂本泰一: AML1 Runt domain に結合する RNA aptamer の立体構造にもとづく相互作用モデル。BMB2007、横浜、2007 年年12月11-15日
6. 大内 将司、中村 義一(東大・医科研)標的細胞特異的 aptamer の効率的な取得、第10回 RNA ミーティング、2008 年7月23-25日(札幌)
7. 岩川 外史郎、大内 将司、渡邊 すみ子、中村 義一(東大・医科研)マウス ES 細胞を特異的に認識する RNA aptamer の取得、第10回 RNA ミーティング、2008 年7月23-25日(札幌)
8. 森祐介、大内将司、中村義一: T7RNA ポリメラーゼ、SP6RNA ポリメラーゼの転写反応を阻

- 害する RNA アプタマーの取得、第 10 回 RNA ミーティング、2008 年 7 月 23-25 日 (札幌)
9. 藤本悠希、大内将司、中村義一:タンパク質の機能制御を担う RNA 因子群の新規検索法、第 10 回 RNA ミーティング、2008 年 7 月 23-25 日 (札幌)
  10. 遠藤慧、伊藤大輔、小黒明広、中村義一: Cy3 に結合する RNA アプタマーの取得とその機能評価、第 10 回 RNA ミーティング、2008 年 7 月 23-25 日 (札幌)
  11. 猪股恵美礼((株)リボミック)、宮川伸、山浦順司、青木一晃、中村義一: IgG アプタマー-RNA の修飾とヌクレアーゼ耐性: 第 10 回 RNA ミーティング (第 10 回日本 RNA 学会年会・RNA2008)、札幌コンベンションセンター、2008 年 7 月 23 日~25 日
  12. 飯淵宏昭、野村祐介、横島康弘、千葉学、富士原和也、田中卓、田中陽一郎、福永淳一、神津知子、中村義一、河合剛太、坂本泰一: AML1 Runt domain に結合する RNA アプタマーの NMR 法による解析、日本生化学会関東支部例会、桐生、2008 年 6 月 21 日
  13. 助川伸也、岡田潔、高橋真梨、中村幸治、金井昭夫、河合剛太、坂本泰一、超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* の SRP の構想解析、日本生化学会関東支部例会、桐生、2008 年 6 月 21 日
  14. 増田慧子、菅谷麻希、安藤直樹、原田和雄、河合剛太、坂本泰一: NMR 法による HIV-1 の RRE と K1 ペプチドの相互作用解析、日本生化学会関東支部例会、桐生、2008 年 6 月 21 日
  15. 野村祐介、飯淵宏昭、富士原和也、横島康弘、千葉学、田中卓、田中陽一郎、福永淳一、田中陽一郎、神津知子、野中村義一、河合剛太、坂本泰一: AML1 Runt domain に結合する RNA アプタマーの立体構造解析、第 11 回 RNA ミーティング、2009 年 7 月 27-29 日 (新潟)
  16. 野村祐介、福永淳一、田中陽一郎、大竹良子、河合剛太、神津知子、中村義一、坂本泰一: MTG8 TAF domain に結合する RNA アプタマーの NMR 解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21-24 日 (神戸)
  17. 二見紘史、松田崇志、高橋真梨、岡田潔、中村幸治、金井昭夫、河合剛太、坂本泰一、*Pyrococcus furiosus* の SRP19 と SRP RNA との相互作用解析、第 10 回極限環境微生物学会年会、2009 年 10 月 28-29 日 (東京)
  18. 目谷太樹、井川義也、河合剛太、坂本泰一: 人工 ligase ribosome の活性中心の立体構造解析、第 48 回 NMR 討論会、2009 年 11 月 10 日-12 日 (福岡)
  19. 福永淳一、野村祐介、田中陽一郎、中村義一、坂本泰一、神津知子: MTG8 の TAF ドメインに結合する RNA アプタマーの変異解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日 (横浜)
  20. 石黒亮、秋山泰身、井上純一郎、中村義一: 抗インターロイキン 17 アプタマーによる自己免疫疾患抑制の分子機構、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日 (横浜)
  21. 猪股恵美礼、山崎聡子、宮川伸、中村義一: ヒト IgG に特異的な RNA アプタマー樹脂を用いた新規タンパク質精製法、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日 (横浜)
  22. 神津知子、田中陽一郎、麻生真吾、中村義一、久富崇、末岡榮三朗: microRNA expression profiles of adult T-cell leukemia、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日 (横浜)
  23. 福永淳一、野村祐介、田中陽一郎、中村義一、坂本泰一、神津知子: MTG8 の TAF ドメインに結合する RNA アプタマーの変異解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日 (横浜)
  24. 岩川外史郎、大内将司、綿安部すみ子、中村義一: マウス ES 細胞を特異的に認識する RNA アプタマーの取得、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日 (横浜)
  25. Emire Inomata, Satoko Yamazaki, Shin Miyakawa, Yoshikazu Nakamura: A novel purification method of proteins using RNA aptamer resin specific to human IgG、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日~12 日 (横浜)
  26. 宮川伸、逸見千寿香、猪股恵美礼、中谷百合子、藤原将寿、中村義一: RNA アプタマーと免疫毒性、第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 27-29 日 (東京)
  27. 足立大典、石黒亮、中村義一: ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの創製第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 27-29 日 (東京)
  28. 福永淳一、田中陽一郎、小林泰文、久保田靖子、柵木信男、金子安比古、神津

- 知子：MTG8 アプタマーを用いた白血病融合タンパク質 AML1-MTG8 の高感度検出法の開発、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日（大阪）
29. 森祐介、大内将司、中村義一：T7 RNA polymerase の転写反応を阻害する RNA アプタマー：翻訳を介さない新規遺伝子回路の構築を目指して、第12回日本 RNA 学会年会、2010年7月27～29日（東京）
  30. 石黒亮、秋山泰身、足立宏典、井上純一郎、中村義一：自己免疫疾患モデルマウスを用いた RNA アプタマーによるインターロイキン 17 の機能制御、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7～10日（神戸）
  31. 藤本悠希、大内将司、中村義一：HEXIM1 タンパク質と相互作用する新規 mRNA エLEMENT の同定、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7～10日（神戸）

#### 国際会議

- 1 T. Sakamoto, A. Oguro, G. Kawai, T. Ohtsu and Y. Nakamura: Solution Structures of Two Hairpin Loops of an RNA Aptamer against Mammalian Initiation Factor 4A. 11th Annual Meeting of the RNA Society, June 20-25, 2006 (Seattle, U.S.A.)
- 2 Endo, K., Oguro, A., Nakamura, Y.: Selection and characterization of RNA aptamers specific to eIF4AIII of eIF4A family proteins. Cold Spring Harbor meeting on "Translational Control", September 6-10, 2006
- 3 Oguro, A., Nakamura, Y.: New property of eIF1A revealed by analyses with RNA aptamer. Cold Spring Harbor meeting on "Translational Control", September 6-10, 2006
- 4 Ohuchi, S.P., Ikawa, Y., Nakamura, Y. *In vitro* selection of novel RNA-RNA interaction motifs using the DSL ribozyme. International Symposium of RNA-Ligand Interactions. Sep 27-29, 2007 (Frankfurt).
- 5 Ohuchi, S.P. and Nakamura, Y. Slight sequence modifications unexpectedly alter the metal-dependency of a kissing-loop. The 5<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. Nov 20-22, 2007 (Tokyo).
- 6 Ohuchi, S.P., Ikawa, Y., Nakamura, Y.: Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference. Jun 28-Jul 3, 2008 (Athens).
- 7 Y. Yamamura, A. Oguro, K. Ito, Y. Nakamura: Negative regulation of translation by Smad3. The 28<sup>th</sup> Sapporo Cancer Seminar International Symposium, June 26-27, 2008 (Sapporo, Japan)
- 8 Miyakawa, S, Yamazaki, S., Inomata, E., Nomura, Y., Sakamoto, T., Yamaguchi, Y., Kato, K., Matsumura, H., Sugiyama, S., Mori, Y., and Nakamura, Y.: Structural basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human IgG and its application to affinity purification of therapeutic antibody, 13th Annual Meeting of the RNA Society, Berlin-Dahlem, Germany, July 28 - August 3, 2008
- 9 J. Fukunaga, Y. Tanaka, Y. Nomura, Y. Nakamura, T. Sakamoto, T. Kozu: Isolation and mutational analysis of an RNA aptamer against the AML1 Runt domain. 13th Annual Meeting of the RNA Society, Berlin-Dahlem, Germany, July 28 - August 3, 2008
- 10 T. Sakamoto, Y. Nomura, Y. Yamaguchi, K. Kato, S. Miyakawa, S. Yamazaki and Y. Nakamura: Analysis of an aptamer's interaction with immunoglobulin G. 13th Annual Meeting of the RNA Society, July 28- August 25, 2008 (Berlin, Germany)
- 11 J. Fukunaga, Y. Tanaka, Y. Nomura, Y. Nakamura, T. Sakamoto, T. Kozu: Isolation and mutational analysis of an RNA aptamer against the AML1 Runt domain. 13th Annual Meeting of the RNA Society, July 28- August 25, 2008 (Berlin, Germany)
- 12 Y. Nomura, K. Fujiwara, M. Chiba, H. Iibuchi, T. Tanaka, Y. Tanaka, J. Fukunaga, T. Kozu, Y. Nakamura, G. Kawai and T. Sakamoto. 13th Annual Meeting of the RNA Society, July 28- August 25, 2008 (Berlin, Germany)
- 13 S. Miyakawa, S. Yamazaki, E. Inomata, Y. Nomura, T. Sakamoto, Y. Yamaguchi, K. Kato, H. Matsumura, Y. Mori, and Y. Nakamura: Structural basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human IgG and its application to affinity purification of therapeutic antibody. 13th Annual Meeting of the RNA Society, July 28- August 25, 2008 (Berlin, Germany)
- 14 Matsumura, H., Sugiyama, S., Kitami, T., Nomura, Y., Sakamoto, T., Miyakawa, S., Nakamura, T., Maki, S., Yoshikawa, H.Y., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, T: Crystal structure of RNA aptamer in complex with human immunoglobulin G. XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, August 23-31,

- 2008 (Osaka)
- 15 Haraguchi, Y., Kuwasako, K., Muto, Y., Bessho, Y., Nishimoto, M., Yokoyama, S., Kanai, A., Kawai, G., Sakamoto, T., Characterization of RNA aptamers against SRP19 protein having sequences different from SRP RNA, The 6<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2009, Sep 27-Oct 1, 2009 (Takayama)
  - 16 Meya, H., Kawai, G., Ikawa, Y., Sakamoto, T.: NMR analysis of the catalytic core of an artificial ligase ribozyme. The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, Nov 10-12, 2010 (Yokohama)
  - 17 Maeda, T., Masuda, K., Sugaya, M., Aoyama, S., Kawai, G., Harada, K., Sakamoto, T., NMR analysis of interaction between high affinity arginine-rich peptides and their target RNAs, The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, Nov 10-12, 2010 (Yokohama)
  - 18 Ishiguro, A., Akiyama, T., Adachi, H., Inoue, J., Nakamura, Y.: A chemically specified RNA aptamer against human interleukin-17 has broad therapeutic potential in autoimmune disease. The 10<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 7-10, 2010 (Awaji)

#### (4)知財出願

##### 1. 特許出願

###### ① 国内出願(8件)

1. 「免疫グロブリン G に結合する核酸とその利用法」  
発明者:宮川伸、中村義一  
出願人:株式会社リボミック、東京大学  
出願日:平成 17 年 7 月 5 日  
出願番号:特願 2005-195717  
備考:平成 18 年 5 月 14 日付で東京大学の持ち分が株式会社リボミックに譲渡された。  
PCT 出願に伴い取り下げ。
2. 「RUNTドメインに結合するリボ核酸」  
発明者:中村義一、田中陽一郎、神津知子、福永淳一  
出願人:東京大学、神津知子  
出願日:平成17年 11月 14日  
出願番号:特願2005-328757  
備考:審査請求行わず放棄
3. 「ミッドカインに対するアプタマー及びその使用」  
発明者:宮川伸、藤原将寿、中村義一、松井隆、佐久間貞俊  
出願人:株式会社リボミック、株式会社セルシグナルズ  
出願日:平成 18 年 11 月 14 日  
出願番号:特願 2006-308482  
備考:平成 19 年 8 月 28 日付で株式会社セルシグナルズの持ち分が株式会社リボミック  
に譲渡された。PCT 出願に伴い取り下げ。
4. 「ミッドカインの活性阻害能を有する疎水性物質付加核酸及びその使用」  
発明者:宮川伸、藤原将寿、中村義一  
出願人:株式会社リボミック  
出願日:平成 19 年 11 月 14 日  
出願番号:特願 2007-295951  
備考:PCT 出願に伴い取り下げ
5. 「MTG8 TAFドメインに結合するリボ核酸」  
発明者:神津知子、田中陽一郎、福永淳一  
出願人:神津知子

出願日:平成19年 1月 11日

出願番号:特願2007-3654

6. 「IL-17に対するアダマール及びその使用」

発明者:中村義一、石黒亮、大内将司

出願人:東京大学

出願日:平成20年7月14日

出願番号:特願2008-183233

備考:PCT出願に伴い取り下げ

7. 「FGF2に対するアダマール及びその使用」

発明人:中村義一、石黒亮、坂本真衣子

出願人:国立大学法人東京大学

出願番号:特願2010-29377

出願日:2010年2月12日

8. 「TGF- $\beta$  II型受容体に結合する核酸およびその使用」

発明人:中村義一、山村康子

出願人:国立大学法人東京大学

出願番号:特願2009-198813

出願日:2009年8月28日

備考:PCT出願に伴い取り下げ

② 海外出願 (7件)

1. 「Nucleic acids with a high affinity for immunoglobulin G and their methods of use」

発明者:宮川伸、中村義一

出願人:宮川伸、中村義一

出願日:平成 17 年 12 月 12 日

出願番号:60/749,026

備考:PCT 出願に伴い取り下げ

2. 「免疫グロブリン G に結合する核酸とその利用法」

発明者:宮川伸、中村義一

出願人:株式会社リボミック、宮川伸(USのみ)、中村義一(USのみ)

出願日:平成 18 年 7 月 5 日(PCT 出願)、平成 18 年 12 月 1 日(台湾出願)

出願番号:PCT/JP2006/313811 及び 台湾出願第 95144614 号

備考:EPC、米、日、韓国、カナダ、中国、インドに国内移行済

3. 「調節性 T 細胞の機能異常に基づく疾患の治療方法及び予防方法」

発明者:宮川伸、藤原将寿、中村義一、松井隆、佐久間貞俊、錫村明生、王金岩

出願人:株式会社リボミック、株式会社セルシグナルズ

出願日:平成 18 年 11 月 14 日

出願番号:PCT/JP2006/322659

備考:EPC、米、日に国内移行済。株式会社セルシグナルズの持ち分が Medical Therapies Ltd.に譲渡され、平成 20 年 8 月現在、リボミック社と同社との共有

4. 「ミッドカインに対するアダマール及びその使用」

発明者:宮川伸、藤原将寿、中村義一、松井隆、佐久間貞俊

出願人:株式会社リボミック、

出願日:平成 19 年 11 月 14 日(PCT、台湾出願とも)

出願番号:PCT/JP2007/072099 及び 台湾出願第 96142969 号

5. 「疎水性物質付加核酸及びその使用」

発明者:宮川伸、藤原将寿、中村義一

出願人:株式会社リボミック、

出願日:平成 20 年 11 月 14 日

出願番号:PCT/JP2008/070822

6. 「IL-17 に対するアプタマー及びその使用」

発明人:中村義一、石黒亮、大内将司

出願人:国立大学法人東京大学

出願番号:PCT/JP2009/062764

出願日:2009 年 7 月 14 日

7. 「TGF- $\beta$  II 型受容体に結合する核酸およびその使用」

発明人:中村義一、山村康子

出願人:国立大学法人東京大学

出願番号:PCT 出願(PCT/JP2010/064612)

出願日:2010 年 8 月 27 日

8. 「FGF 2 に対するアプタマー及びその使用」

発明者:中村義一、石黒亮、坂本真衣子

出願人:国立大学法人東京大学

出願番号:PCT/JP2011/052925

出願日:2011 年 2 月 10 日

- ③ その他の知的財産権  
特になし。

(5)受賞・報道等

①受賞

該当なし。

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 薬事日報 2005 年 5 月 13 日 「大学発ベンチャー『リボミック』誕生」
2. 日経産業新聞 2005 年 6 月 16 日 「人工 RNA 使い創薬」
3. 化学工業日報 2005 年 7 月 8 日 「人工 RNA 創薬を本格化 -リボミック 分離剤・試薬など先行」
4. 日経産業新聞 2005 年 7 月 15 日 「創薬 VB リボミック ラボ新設、社員倍増」
5. 日経バイオビジネス 2005 年 9 月号(8 月 15 日発行) 「トレンド 抗体医薬の死角を狙うアプタマー医薬 実用化では RNAi の先輩格 広い守備範囲に高まる期待」
6. 日経産業新聞 2006 年 12 月 5 日 「リボミック 人工 RNA 使い分離剤 抗体医薬の製造向け」
7. 化学工業日報 2006 年 12 月 15 日 「RNA アプタマー 来年から非臨床試験開始 高活性で特許もシンプル 医薬応用へ弾み」
8. 日本経済新聞 2006 年 12 月 18 日 「多発性硬化症 人工リボ核酸で緩和 リボミックなど新薬候補開発」
9. 日経産業新聞 2006 年 12 月 20 日 「アプタマー 多発性硬化症を治療 細胞の表面で炎症物質阻害」
10. Biotechnology Japan 2007 年 2 月 13 日 「リボミック、多発性硬化症治療薬、米国で 08 年に新薬治験申請を計画」
11. Medical ASAHI 2007 年 3 月号 「遺伝子研究の新世紀 RNA ルネッサンスの到来」

12. 医薬経済 2007年4月15日号「第4回ベンチャー企業探訪 株式会社リボミック日本初『アプタマー』の長い道のり
13. 日経産業新聞 2007年6月19日「リボミック RNA創薬技術磨く 研究資金の確保課題に」
14. 日経産業新聞 2008年3月14日「次世代の核酸医薬 バイオVB、技術を主導 ヒット薬特許切れ 大手製薬、連携狙う」
15. 日経産業新聞 2008年7月11日「核酸医薬、国内にも登場」
16. 日経新聞 2009年9月28日「多発性硬化症、東大などが新薬候補」
17. 日刊工業新聞 2010年7月30日「RNAと標的分子 電氣的引力使わず結合 阪大・東大など新たな仕組み解明」
18. 日経産業新聞 2010年8月3日「RNAアプタマーとたんぱく質 結合の仕組み解明 阪大・東大」
19. 科学新聞 2010年8月13日「RNAアプタマーが標的分子を捕える仕組み—阪大、東大などのグループ発見—」
20. 朝日新聞 2010年8月13日「RNA、医薬応用の可能性拡大」
21. 日経産業新聞 2010年8月14日「2010年への挑戦、次世代産業技術、人工核酸アプタマー」
22. 読売新聞 2010年8月17日「がん阻害分子働く範囲拡大 阪大など解明」
23. 日経産業新聞 2010年11月12日「人工RNAで炎症抑制」
24. 日刊工業新聞 2010年11月13日「炎症抑えるRNA開発」

#### プレス発表

##### 1. 平成22年7月28日

「JST 課題解決型基礎研究の一環として、大阪大学 大学院工学研究科の松村浩由准教授らと東京大学医科学研究所の中村義一教授らは、RNAアプタマーが標的分子を捕捉する新しい仕組みを構造解析によって明らかにしました」

##### 2. 平成22年10月28日

「JST 課題解決型基礎研究の一環として、東京大学医科学研究所の中村義一教授と石黒亮特任助教らの研究グループはインターロイキン17(IL-17)と呼ばれるたんぱく質と結合し、その生理活性を抑える人工的なリボ核酸(RNA)分子の開発に成功しました」

#### ③その他

平成20年3月30日、中村義一 テレビ番組「話題の医学」放映、「アプタマー医薬品」

#### (6)成果展開事例

##### ① 実用化に向けての展開

- ・ PCT/JP2006/313811 は CREST 研究の前に実施された内容で PCT 出願されているが、本 CREST 研究によって製品としての品質が飛躍的に向上し、現在、リボミック社が複数の製薬メ

ーカーならびに樹脂化学企業と導出のための交渉を実施中。

## ② 社会還元的な展開活動

- ・ 本研究成果をもとに、“RNA Plasticit”という概念を提言した。
- ・ 核酸医薬は次世代医薬として期待されており、アプタマーは抗体に代わる次世代の分子標的医薬のホープであることを、本研究成果をもとに、講演や TV 出演のおりにアピールしている。

## § 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2006.12.3-7	Functional RNAs and Regulatory Machinery	伊豆	200	国際シンポジウム (海外招聘者20名)
2007.11.19	第23回 Wako ワークショップ	東京	200	RNA ルネッサンス:新しい生命理解と臨床への挑戦
2007.12.12	BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)	横浜	250	RNA 医工学のフロンティア
2008.9.10-18	FEBS Advanced Lecture Course	Spetses, Greece	100	“New Developments in Quantitative Molecular Bioscience”
2009.2.4	ビジネスマッチングフォーラムイン千葉	千葉	118	材料としてのRNA
2009.10.18-21	英国 BBSRC Conference on Evolution and Design of Biomolecular Systems	スペイン、Mallorca 島	40	Systems BiologyとSynthetic Biologyの境界領域創成を目的とした国際会議
2010.9.11-17	FEBS Advanced Lecture Course	Spetses, Greece	100	“Aptamer as an emerging technology for biomedical application”

## § 7 結び

RNAの高機能なポテンシャルに着目して、「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」に資する医用マテリアルとしての基盤研究を、平成17年度からCREST研究「多目的RNAナノセンサー・モジュレーターの開発」として実施し、今年度がその最終年度にあたる。その結果、RNAの優れた「造形力」や静電的な相互作用に依存しない結合力を明らかにすることができた点は、学術的にも相応な貢献をなし得たと考えている。本研究の中から提言した“RNA

Plasticity”という生物学的には新しいコンセプトが広く認知され、またその学理が深く理解されるように、今後とも努力していきたい。同時に、そのような RNA の造形力に裏打ちされて、各種のサイトカインや受容体に対するアンタゴニスト RNA アプタマーを創製することができた。それらの中には、すでに、動物試験において優れた薬効を示す RNA アプタマーが確認され、具体的な医薬開発の遡上に上っている。これら5年余の成果を総括すれば、従来の医薬にはないカテゴリーの RNA 新薬の開発が可能であることを示し、RNA の高機能なポテンシャルが、「夢から現実」へ変貌したと言っても過言ではない。同時に、これらの研究の中で、RNA の造形に関する構造生物学のインパクトが、同じ研究領域の森 CREST チームとの共同研究によって明らかになった成果は、我々の誇りとするところでもある。

我々のチームは、我が国においては唯一、かつ世界的にも最先端の、「RNA アプタマー」に特化した specialist グループで、その基礎から実用化までを視野に入れた実行型の編成が特徴であるが、その目論みが功を奏したと自負している。今後は、本研究で創製した RNA アプタマーを医薬品として開発すべく、努力を傾注していきたい。